

10/538062

JC17 Rec'd PCT/PTO 09 JUN 2005

DOCKET NO.: 273506US2PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Ulrich BOCKELMANN, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/02091

INTERNATIONAL FILING DATE: July 4, 2003

FOR: METHOD FOR ELECTRONICALLY DETECTING AT LEAST ONE SPECIFIC  
INTERACTION BETWEEN PROBE MOLECULES AND TARGET BIOMOLECULES

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that  
the applicant claims as priority:


**COUNTRY**  
PCT

**APPLICATION NO**  
PCT/FR02/04283

**DAY/MONTH/YEAR**  
11 December 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the  
International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/02091. Receipt of the certified  
copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been  
acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

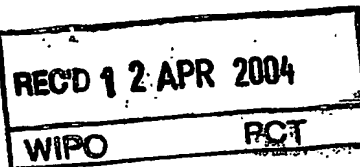
Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Marvin J. Spivak  
Attorney of Record  
Registration No. 24,913  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number  
**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)



# BREVET D'INVENTION

**COPIE CERTIFIÉE CONFORME  
D'UNE DEMANDE INTERNATIONALE**

FR /03/ 2091

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande internationale déposée auprès de l'Institut en application du Traité de Coopération en matière de brevets (PCT) fait à Washington le 19 juin 1970.

Fait à Paris le 21 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30  
<http://www.inpi.fr>

BEST AVAILABLE COPY

**COPIE POUR  
L'OFFICE RÉCEPTEUR**

1/5

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 11.12.2002 12:06:26 PM

PJF644/71PCT

0	Réservé à l'office récepteur	
0-1	Demande internationale No.	<b>PCT/FR 02/04283</b>
0-2	Date du dépôt international	<b>11 DEC. 2002 (11/12/02)</b>
0-3	Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	<b>INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE DEMANDE INTERNATIONALE PCT</b>
0-4	Formulaire - PCT/RO/101 Requête PCT	
0-4-1	Préparé avec	<b>PCT-EASY Version 2.92 (mis à jour 01.10.2002)</b>
0-5	Pétition Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets	
0-6	Office récepteur (choisi par le déposant)	<b>Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)</b>
0-7	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	<b>PJF644/71PCT</b>
I	Titre de l'invention	<b>PROCEDE DE DETECTION D'AU MOINS UN PARAMETRE CARACTERISTIQUE DE MOLECULES SONDAS FIXEES SUR AU MOINS UNE ZONE ACTIVE D'UN CAPTEUR.</b>
II	Déposant	
II-1	Cette personne est :	<b>Déposant seulement</b>
II-2	Déposant pour	<b>Tous les Etats désignés sauf US</b>
II-4	Nom	<b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>
II-5	Adresse:	<b>3, rue Michel-Ange F-75794 PARIS CEDEX 16 France</b>
II-6	Nationalité (nom de l'Etat)	<b>FR</b>
II-7	Résidence (nom de l'Etat)	<b>FR</b>
III-1	Déposant et/ou inventeur	
III-1-1	Cette personne est :	<b>Déposant et inventeur</b>
III-1-2	Déposant pour	<b>US seulement</b>
III-1-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	<b>BOCKELMANN, Ulrich</b>
III-1-5	Adresse:	<b>33, rue des Cascades F-75020 PARIS France</b>
III-1-6	Nationalité (nom de l'Etat)	<b>DE</b>
III-1-7	Résidence (nom de l'Etat)	<b>FR</b>

## REQUETE PCT

PJF644/71PCT

Original (pour PRESENTATION) - Imprimé le 11.12.2002 12:06:26 PM

III-2	Déposant et/ou inventeur	Déposant et inventeur
III-2-1	Cette personne est :	US seulement
III-2-2	Déposant pour	
III-2-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	POUTHAS, François
III-2-5	Adresse:	18, rue des Gobelins F-75013 PARIS France
III-2-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
III-2-7	Résidence (nom de l'Etat)	FR
IV-1	Mandataire ; Représentant commun ou adresse pour la correspondance. La personne nommée ci-dessous est/ a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme	mandataire
IV-1-1	Nom	CABINET ORES
IV-1-2	Adresse:	36, rue de St Petersburg F-75008 PARIS France
IV-1-3	No. de téléphone	01.53.21.11.00
IV-1-4	No de télécopieur:	01.53.21.08.88
IV-1-5	Courrier électronique:	ores@cabinet-ores.com
IV-2	Mandataire(s) supplémentaire(s)	Mandataires supplémentaires ayant la même adresse que le mandataire nommé en premier
IV-2-1	Nom(s)	ORES, Béatrice; VIALLE-PRESLES, Marie-José; DOIREAU, Marc; JACQUARD, Philippe; SCHWARTZ, Thierry; GOULARD, Sophie; GALUP, Cédric; ORES, Irène; ORES, Bernard

## REQUETE PCT

PJF644/71PCT

Original (pour PRESENTATION) - Imprimé le 11.12.2002 12:06:26 PM.


V	Désignation d'Etats	
V-1	Brevet régional (d'autres formes de protection ou de traitement, le cas échéant, sont spécifiées entre parenthèses pour les Etats désignés concernés)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurásien et du PCT</p> <p>EP: AT BE BG CH&amp;LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT [(s)]</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT</p>
V-2	Brevet national (d'autres formes de protection ou de traitement, le cas échéant, sont spécifiées entre parenthèses pour les Etats désignés concernés)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&amp;LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SC SD SE SG [ST] SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>
V-5	Déclaration concernant les désignations de précaution Outre les désignations faites sous les rubriques V-1, V-2 et V-3, le déposant fait aussi, conformément à la règle 4.9.b), toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation(s) indiquée(s) dans la rubrique V-6 ci-dessous. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité sera considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai.	
V-6	Exclusion(s) des désignations de précaution	NEANT
VI-1	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-1-1	Date de dépôt	21 janvier 2002 (21.01.2002)
VI-1-2	Numéro	0200676
VI-1-3	Pays	FR

RENTLI PAK RO

## REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION) - Imprimé le 11.12.2002 12:06:26 PM

PJF644/71PCT

VI-2	Requête pour le document de priorité L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau International une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures mentionnées ci-dessus sous la/les rubriques:	VI-1	
VII-1	Administration chargée de la recherche internationale choisie	Office européen des brevets (OEB) (ISA/EP)	
VII-2	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche		
VII-2-1	Date	24 septembre 2002 (24.09.2002)	
VII-2-2	Numéro	FA 614060	
VII-2-3	Pays (ou office régional)	EP	
VIII	Déclarations	Nombre de déclarations	
VIII-1	Déclaration relative à l'identité de l'inventeur	-	
VIII-2	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet	-	
VIII-3	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité de la demande antérieure	-	
VIII-4	Déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique)	-	
VIII-5	Déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté	-	
IX	Bordereau	Nombre de feuilles	
IX-1	Requête (y compris les feuilles pour déclaration)	5	-
IX-2	Description	15	-
IX-3	Revendications	3	-
IX-4	Abrégé	1	EZABST00.TXT
IX-5	Dessins	12	-
IX-7	TOTAL	36	
	Éléments joints	Document(s) papier joint(s)	
IX-8	Feuille de calcul des taxes	✓	-
IX-17	Disquette PCT-EASY	-	Disquette
IX-19	Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé	1	
IX-20	Langue de dépôt de la demande internationale	français	
X-1	Signature du déposant, du mandataire ou du représentant commun		
X-1-1	Nom	CABINET ORES	
X-1-2	Nom du signataire	JACQUARD Philippe	
X-1-3	Qualité	Mandataire	

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION ) - Imprimé le 11.12.2002 12:06:26 PM

PJF644/71PCT

## RESERVE A L'OFFICE RECEPTEUR

10-1	Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale	11 DEC. 2002 (11/12/02)
10-2	Dessins:	
10-2-1	Reçus	
10-2-2	non reçus	
10-3	Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale:	
10-4	Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT	
10-5	Administration chargée de la recherche internationale	ISA/EP
10-6	Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche	

## RESERVE AU BUREAU INTERNATIONAL

11-1	Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau International	
------	--	--

**PROCEDE DE DETECTION D'AU MOINS UN PARAMETRE  
CARACTERISTIQUE DE MOLECULES SONDES FIXEES SUR AU MOINS  
UNE ZONE ACTIVE D'UN CAPTEUR.**

5           La présente invention a pour objet un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur des zones d'un capteur.

On connaît déjà un procédé de détection de l'hybridation de séquences d'ADN à l'aide d'un transistor à effet de champ, tel qu'il a été décrit dans l'article de E. SOUTEYRAND et collaborateurs intitulé « Direct  
10   Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect » paru en 1997 dans le J. Phys. Chem. B1997, 101, pages 2980 à 2985. Un transistor de type ISFET (« Ion-Sensitive – Field Effect Transistor ») utilisable dans ce type d'application a été décrit dans l'article de  
15   Piet BERGVELD « Development, Operation and Application of the ISFET as a Tool for Electrophysiology paru dans IEEE Transactions on Biomedical Engineering volume BME-19 – n° 5 Sept 1972 pages 342 à 351. Des indications sur la fabrication de telles structures de transistors peuvent être  
20   trouvées dans l'article de V. KIESSLING et collaborateurs, intitulé « Extracellular Resistance in Cell Adhesion. Measured with a Transistor Probe » paru dans Langmuir 2000 16, pages 3517 – 3521. Enfin un mode de préparation des surfaces a été décrite dans l'article de A. KUMAR et  
collaborateurs, intitulé « Silanized nucleic acids : a general platform for DNA immobilization » paru dans Nucleic Acid Research 2000, volume 28, n° 14,  
25   pages i à vi.

Deux procédés de fixation des molécules sondes sur la surface sont notamment utilisables dans le cadre de la présente invention. Le premier consiste en une synthèse directe sur solide, telle que décrite par exemple dans l'article de S.P.A. Fodor et Collaborateurs intitulé « Light-  
30   directed, spatially adressable parallel chemical synthesis » paru dans Science 251, pages 767 à 773 (1991). Le deuxième est la fixation des molécules à partir d'une dilution.

Dans le cas des capteurs comportant une pluralité de zones actives, par exemple les puces à ADN, ou les puces à protéines, il n'existe  
35   pas actuellement de technique disponible permettant de contrôler facilement



et de manière relativement rapide sur quelles zones des molécules sondes ont été fixées effectivement.

La présente invention a ainsi pour but un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur au moins une zone d'un capteur, notamment en vue de contrôler le dépôt et la fixation locales des molécules sondes, pour permettre en particulier de remédier au moins partiellement aux problèmes que posent les variations expérimentales importantes qui sont fréquemment rencontrées en pratique.

La présente invention concerne ainsi un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur au moins une zone active d'un capteur, caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ dont chacun présente une région de source, une région de drain, et une région de porte qui constitue une dite zone active sur laquelle ledit paramètre représentatif des molécules sondes doit être détecté et en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) mettre en contact certaines desdites zones avec des molécules sondes pour réaliser leur fixation,

b) baigner dans une solution d'électrolyte au moins ces zones qui ont été mises en contact avec des molécules sondes,

c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte / tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un premier groupe correspondant à des zones mises en contact avec des molécules sondes, par exemple en appliquant à ces transistors du premier groupe dont le drain et la source ont été polarisés, une tension donnée par exemple constante entre la porte et la source ou bien un courant de drain donné par exemple constant, pour en déduire au moins un dit paramètre représentatif par comparaison entre au moins deux des mesures obtenues pour deux différentes zones. Ladite comparaison est préférentiellement réalisée à l'aide d'une mesure différentielle. Le paramètre représentatif peut être une détection de la fixation de molécules sondes.

Entre les étapes a et b, il peut être prévu un rinçage.

Selon un mode particulier de mise en œuvre, le procédé est caractérisé en ce qu'il comporte après a) et avant b) les étapes suivantes :

a1) rinçage

a2) ajout d'une solution contenant des molécules cibles susceptibles d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes, par exemple de s'hybrider avec celles-ci dans le cas où les molécules sondes sont de l'ADN, éventuellement suivi d'un rinçage.

5 Selon un autre mode particulier de mise en œuvre, le procédé est caractérisé en ce qu'il comporte après c, les étapes suivantes :

d) ajout d'une solution d'électrolyte contenant des molécules cibles susceptible d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes, par exemple de s'hybrider dans le cas où les molécules sondes sont de l'ADN.

10 e) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte / tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un deuxième groupe correspondant à des zones mises en contact avec des molécules sondes et avec des molécules cibles, par exemple en appliquant une tension par exemple constante entre la porte et la  
15 source de ces transistors du deuxième groupe dont le drain et la source ont été polarisés ou un courant donné par exemple constant à la source de ces transistors du deuxième groupe, pour obtenir par comparaison au moins un dit paramètre représentatif.

20 Le procédé peut mettre en œuvre une pluralité de dites mesures d'au moins un point de la caractéristique, qui sont espacées au cours du temps. Ceci permet une mesure doublement comparative, dans l'espace et dans le temps.

Selon une première variante, la comparaison, notamment par mesure différentielle, est réalisée entre au moins deux transistors  
25 correspondant à des zones qui sont baignées par une solution d'électrolyte, après avoir été mises en contact avec des molécules sondes.

Selon une deuxième variante préférée, cette comparaison, notamment par mesure différentielle, est réalisée entre au moins un transistor correspondant à une zone qui est baignée par une dite solution d'électrolyte  
30 après avoir été mise en contact avec des molécules sondes et au moins un transistor correspondant à une zone qui est baignée par ladite solution d'électrolyte sans avoir été préalablement mise en contact avec des molécules sondes.

35 Les molécules sondes sont par exemple des molécules d'ADN, d'ARN ou de protéines.

Le procédé selon l'invention est compatible avec une détection classique d'interaction moléculaire par fluorescence.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description ci-après, en liaison avec les  
5 dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente deux transistors à effet de champ d'une puce de détection comprenant une pluralité de tels transistors organisés suivant un réseau mono ou bidimensionnel de transistors ;

- la figure 2 représente en vue de dessus un détail d'une puce  
10 de détection et l'agencement des zones actives correspondant chacune à un transistor à effet de champ ;

- la figure 3 illustre les connexions électriques de drain des transmissions du réseau mono ou bidimensionnel, la figure 4 représentant la résistance des différentes connexions électriques de drain, la courbe A  
15 représentant les valeurs calculées et la courbe B les valeurs mesurées, l'écart entre les courbes étant dû pour l'essentiel à la résistance de canal qui est constante.

- la figure 5 représente un dispositif de dépose de la solution sur des zones actives sélectionnées ;

- la figure 6 illustre la détection de présence d'ADN silanisé et de poly-L-lysine avec  $U_{SG}$  et  $U_{SD}$  constants, par variation du courant de drain  $I_{SD}$  ; et  
20

- la figure 7 illustre la détection de présence d'ADN silanisé et de poly-L-lysine avec  $I_{SD}$  et  $U_{SD}$  constants, par détection de la variation de la  
25 tension  $U_{SG}$  ;

- les figures 8A à 8C représentent les résultats d'expériences réalisées dans différentes conditions expérimentales ;

- les figures 9A à 9D montrent une détection électronique d'ADN ;

- et les figures 10A et 10B illustrent la mise en œuvre de  
30 canaux microfluidiques.

Les figures 1 à 3 illustrent un capteur présentant un réseau de transistors à effet de champ sur un substrat en silicium. Un transistor  $T_1$  ou  $T_2$  représenté en coupe à la figure 1 est pourvu d'une région de source S et  
35 d'une région de drain D qui présentent chacune un contact électrique et qui sont surmontées d'une couche isolante respectivement 1 et 2, par exemple

un oxyde thermique de  $\text{SiO}_2$ . La région active 3 entre la source S et le drain D forme la région de porte G du transistor et présente une couche isolante 4 d'épaisseur réduite, par exemple une couche de  $\text{SiO}_2$  thermique. Il est également possible de ne pas disposer d'oxyde sur cette région active. La surface active est alors délimitée par une portion 4' du substrat qui est mise à nu.

Des molécules sondes, par exemple des molécules d'ADN simple brin, sont fixées par un procédé connu sur au moins certaines des surfaces actives 4 ou 4'. Pour l'ADN, on utilise de préférence des transistors à effet de champ à canal n à appauvrissement (pour lesquels les porteurs de charge sont les électrons, plus mobiles d'où une augmentation de la sensibilité) avec une polarisation de porte négative (c'est-à-dire que l'électrolyte est polarisé négativement par rapport au semi-conducteur), l'ADN se chargeant négativement (pour un électrolyte de pH neutre).

L'application d'une tension source-drain  $U_{SD}$  entre la source S et le drain D ( $U_{SD1}$  pour  $T_1$ , et  $U_{SD2}$  pour  $T_2$ ) et d'une tension porte-source  $U_{GS}$  entre l'électrolyte 6 et la source S (par exemple par une électrode E unique Ag/AgCl) induit un gaz bidimensionnel de porteurs de charges à l'interface  $\text{Si}/\text{SiO}_2$ , ou à l'interface  $\text{Si}/\text{électrolyte}$  de chaque transistor. Il en résulte un courant de drain  $I_D$  qui, pour chaque transistor, dépend de façon sensible de la charge à l'interface  $\text{SiO}_2/\text{électrolyte}$  ou  $\text{Si}/\text{électrolyte}$ . On appelle surface active cette interface qui fait face au canal entre la source S et le drain D.

Le courant  $I_D$  dépend de la fixation des molécules sondes, par exemple des molécules d'ADN sur la surface active 4 ou 4'.

Comme le montrent les figures 2 et 3, n structures de type transistor à effet de champ sont intégrées dans un substrat de silicium recouvert d'un isolant ( $\text{SiO}_2$  ou autre) et pourvu de connexions appropriées (métallisation ou de préférence régions conductrices dopées) par les prises de contact électrique de source 10 et de drain ( $D_1, \dots, D_n$ ). A la différence d'une structure de transistor MOS standard, il n'y a pas d'électrode métallique de porte. Ceci correspond à la structure de type « ISFET » (« Ion Sensitive Field Effect Transistor »). On utilise de préférence un substrat de type SOI (silicium sur isolant) qui procure une sensibilité plus élevée.

Les différentes structures sont à faible distance latérale l'une de l'autre et leurs surfaces actives sont en contact avec la même solution de mesure. Une dimension latérale typique dans la micro-électronique actuelle

est inférieure au  $\mu\text{m}$ . Dans la technologie des puces à ADN telle que mise en œuvre dans la présente invention, la dimension latérale est de 5-10  $\mu\text{m}$  pour une synthèse directe sur le solide et de 50-100  $\mu\text{m}$  dans le cas d'une fixation des molécules à partir d'une dilution.

5 Dans la présente configuration de mesure parallèle, plusieurs plots avec différents types de molécules sondes immobilisées sont en contact avec la même solution de mesure et au moins une structure de transistor se situe en dessous de chaque plot. La mise en œuvre de plusieurs transistors par plot est possible au vu des dimensions mentionnées ci-dessus et permet  
10 une redondance dans la détection.

Une électrode E (Ag/AgCl, par exemple), est utilisée pour fixer le potentiel de la solution de mesure 6 (électrolyte) par rapport à la structure en silicium qu'elle recouvre et pour fixer le point de travail des capteurs (transistors). Le potentiel de l'électrolyte 6 peut dans certains cas  
15 être égal à zéro. La solution de mesure 6 qui baigne les capteurs contient des ions à une concentration qui donne une conductivité suffisante et qui ne donne pas lieu à un écrantage trop important au niveau des surfaces actives. Son pH est de préférence neutre.

Le procédé de détection des reconnaissances moléculaires  
20 est basé sur une approche par comparaison, notamment différentielle. La mesure est réalisée en utilisant plusieurs structures de transistor en parallèle. La mesure peut être différentielle par rapport aux différents types de molécules greffées et inclure éventuellement plusieurs transistors par type de molécule. Il est également possible de comparer des signaux avant/après la  
25 réaction qui révèle la reconnaissance moléculaire (et/ou l'évolution pendant cette réaction).

Le procédé selon l'invention permet de contourner les difficultés associées à la sensibilité d'un capteur individuel au pH et à la force ionique et celles associées à une variabilité d'un transistor individuel à l'autre  
30 (ceci inclut la structure de transistor et la qualité de la fixation des sondes).

Un procédé selon un mode de réalisation préféré met en œuvre les étapes suivantes :

a) traitements homogènes de toute la surface isolante pour préparer la fixation des molécules sondes ;

35 b) greffage local de différents types de molécules sondes sur au moins certaines des surfaces actives individuelles ;

c) rinçages homogènes ;

d) mesure électronique : ajouter l'électrolyte de mesure, plonger l'électrode et mesurer les transistors (par exemple un ou plusieurs points de la caractéristique  $I_D$  en fonction de  $U_{SD}$  et de  $U_{SG}$ ), et comparer les résultats obtenus selon les transistors ;

e) rinçages homogènes ;

f) et éventuellement ajout de la solution de molécules cibles en présence d'électrolyte et réaction de reconnaissance ;

g) rinçages homogènes ;

h) mesure électronique, comme (d).

En cas de mise en œuvre des étapes f à h, il est possible d'omettre c et d, c'est-à-dire de ne faire qu'une mesure électronique.

Certains transistors qui n'ont pas été mis en présence de molécules sondes (ou bien un seul transistor) peuvent servir de témoins. On mesure leurs caractéristiques après ajout de l'électrolyte de mesure qui par exemple, baigne l'ensemble des transistors.

Le greffage des molécules sondes est réalisé par dépôt de micro-gouttelettes de diamètre environ  $100 \mu$  sur les surfaces actives des transistors à l'aide de micro-plumes métalliques qui sont disponibles commercialement.

Comme le montre la figure 3, le réseau de  $n$  transistors (par exemple  $n = 96$  transistors) présente  $n$  connexions de drain  $D_1, D_2 \dots D_n$  et 2 connexions (non représentées) équivalentes à la source commune. Les résistances série  $R_c$  associées à ces connexions ont des valeurs qui dépendent de l'index  $1 \dots n$  du drain.

Les valeurs de ces résistances  $R_c$ , réalisées par exemple par dopage du silicium, ne sont pas négligeables.

A cet effet les résistances  $R_c$  de connexion de drain sont calculées à partir des longueurs et des sections géométriques des lignes dopées dont on connaît la résistivité. Le calcul est comparé à une mesure de la résistance en fonction de l'index du drain en appliquant une tension continue (par exemple  $U_{SD} = 0,1V$  et  $U_{SG} = 2V$ ). Ceci permet d'obtenir une courbe de compensation donnée à titre d'exemple à la figure 4.

Une installation telle que celle représentée à la figure 5 peut être utilisée pour la mise en œuvre du procédé : sur une table 10, est disposée une platine 12 incorporant un dispositif de commande à micro-

contrôleur pour une table 11 assurant un déplacement selon trois directions perpendiculaires X, Y, Z. Une puce 15 incorporant le réseau de n transistors est disposée sur un support 14. Une autre platine 20 comportant une table 21 assurant un déplacement selon les trois directions X, Y, et Z est mise en œuvre pour déplacer un bras 22 portant une micro-plume ou une pipette 23 pour assurer le dépôt des micro-gouttelettes sur au moins certains des n transistors. Un objectif 17 et/ou une caméra couplée à un écran 19 permettent d'observer le dépôt des micro-gouttelettes et de contrôler les opérations.

On effectue des mesures de courant de drain  $I_D$  avec par exemple  $U_{SG} = 1V$  et  $U_{SD} = 0,9V$  et un électrolyte de pH neutre déposé qui est constitué de KCl à une teneur de 0,1 millimole par litre. Les transistors (canal p à accumulation) ayant leurs sources interconnectées, la tension de source ou la tension de porte peut servir de référence de tension (par exemple la tension de masse).

Une mise en œuvre du procédé sera maintenant décrite en liaison avec la figure 6.

Avant ces mesures, on effectue un traitement global de la surface de la structure Si/SiO<sub>2</sub> par incubation 1-2 minutes dans de l'acide sulfochromique et rinçage sous un courant d'eau déionisée puis incubation 3 à 5 minutes dans une solution de NaOH (60  $\mu$ l NaOH 16N, 420  $\mu$ l d'éthanol et 220  $\mu$ l d'eau), et enfin rinçage sous un courant d'eau déionisée.

La différence entre deux mesures effectuées avant dépôt local mais avant et après un rinçage à l'eau est présentée en petits carrés à la figure 6. Les croix représentent la différence entre une mesure effectuée après dépôt local de deux solutions différentes et une mesure faite avant le dépôt (la mesure faite avant le rinçage à l'eau).

Avec une pointe commerciale 23 (Telechem SMP3B) montée sur le dispositif 22 présenté à la figure 5, on dépose une solution 1 sur les transistors 5-7 (avec un contact entre pointe et surface), les transistors 19-21 et les transistors 33-37 et une solution 2 sur les transistors 66-69, les transistors 76-79, et les transistors 87-89.

Solution 1 : 0,5  $\mu$ l oligonucléotide 20 mer modifiée thiol en 5' à 1 nmol/ $\mu$ l, 9  $\mu$ l sodium acétate 30 mM à pH 4,3, 0,5  $\mu$ l mercaptosilane 5mM dans sodium acétate, que l'on laisse réagir une heure à température ambiante, avant le dépôt.

Solution 2 : Poly-L-lysine (0,01% poids/volume « w/v » final (P8920, Sigma)) dans un tampon PBS 0,1X à pH 7.

Après les dépôts locaux, l'échantillon est séché 15 minutes en atmosphère humide et ensuite 5 minutes à 50°C.

La poly-L-lysine est positive dans l'électrolyte de mesure (pH neutre) à cause des groupements amines ionisés. La diminution du courant observé sur les dépôts de poly-L-lysine est compatible avec l'adsorption d'une charge positive sur la surface.

Pour la solution 1, la modification silane sur l'ADN réagit avec les groupements OH de  $\text{SiO}_2$  et l'ADN est chargé négativement en solution.

Les solutions 1 et 2 donnent donc des signaux de signes opposés.

Une autre mise en œuvre de procédé sera maintenant décrite en liaison avec la figure 7.

On mesure la différence de potentiel de surface  $\Delta U_{\text{SG}}$  correspondant à la mesure avant/après dépôt. Pour déterminer  $\Delta U_{\text{SG}}$ , on mesure la caractéristique bidimensionnelle par exemple  $I_{\text{D}}(U_{\text{SG}}, U_{\text{SD}})$  et on détermine les caractéristiques intrinsèques des 96 transistors en corrigeant numériquement en fonction des résistances  $R_{\text{c}}$  des lignes de drain en série. La modification de l'état de l'interface  $\text{SiO}_2$  induit un changement de la caractéristique intrinsèque qui correspond à un décalage  $\Delta U_{\text{SG}}$  à  $U_{\text{SD}}$  et courant de drain  $I_{\text{D}}$  constants. Ce décalage permet d'obtenir directement une mesure indépendante du point de travail du transistor, contrairement au changement de courant  $\Delta I_{\text{D}}$  présenté dans la figure 6. La valeur  $\Delta U_{\text{SG}}$  permet en première approximation de quantifier le changement de l'interface  $\text{SiO}_2$ /liquide induit par le dépôt local. Selon une variante, on fait varier  $U_{\text{SG}}$  de façon à garder  $I_{\text{D}}$  constant.

Les figures 8A à 8C montrent des mesures différentielles réalisées avant et après dépôt de poly-L-lysine (figure 8A), réalisées en fonction de la concentration en KCl (figure 8B), et réalisées en fonction de la concentration en poly-L-lysine déposée.

A la figure 8A, les variations  $\Delta I_{\text{D}}$  du courant de drain  $I_{\text{D}}$  sont représentées en ordonnée pour chacun des transistors 60 à 96 identifiés en abscisse ( $U_{\text{SG}} = 1 \text{ V}$ ,  $U_{\text{SD}} = 0,9 \text{ V}$  et électrolyte KCl à 0,1 mM). Les différences  $\Delta I_{\text{D}}$  entre deux mesures réalisées avant un dépôt local mais séparées par un rinçage à l'eau sont représentées par des cercles. Les différences  $\Delta I_{\text{D}}$



correspondant à des mesures effectuées avant et après un dépôt local de poly-L-lysine sont représentées par des étoiles. Après le dépôt local on laisse l'échantillon 15 minutes à température ambiante en milieu humide, avant de le sécher à 50°C pendant 5 minutes. La dilution  $C_0$  de la poly-L-lysine est de 0,01 % poids/volume "W/V" final (P8920, Sigma) dans un tampon PBS 0,1x à pH 7.

A la figure 8B, les différences  $\Delta U_{SG}$  de la tension de source-grille  $U_{SG}$  sont mesurées sur une partie des transistors d'un réseau de 62 transistors FET avec  $U_{SD} = 1,2$  V et  $I_D = 50$   $\mu$ A. Les différences entre une mesure de référence (effectuée avant dépôt local et avec une concentration en KCl de 0,01 mM) et de deux séries de mesures (effectués après dépôt local de poly-L-lysine et avec différentes concentrations en KCl) sont représentées par des cercles et des étoiles. Ici, un dépôt local de poly-L-lysine a été effectué dans deux zones distinctes avec la même dilution  $C_0$  que dans le cas de la figure 8A. Lors de chacune des deux séries de mesure, on fait varier la concentration de KCl dans le tampon de mesure entre 0,01 mM et 100 mM, en passant par les valeurs 0,1 mM, 1 mM et 10 mM. Entre les deux séries de mesure, on rince la surface à l'eau. On constate une sensibilité appréciable de la détection de la poly-L-lysine pour des concentrations de KCl entre 0,01 mM et 1 mM, et la hauteur des pics diminue progressivement au-delà de ces valeurs.

La figure 8C montre les variations  $\Delta U_{SG}$  de la tension  $U_{SG}$  en fonction de la concentration en polymère déposé (poly-L-lysine), à savoir  $2C_0$ ,  $C_0$ ,  $C_0/2$ ,  $C_0/4$ ,  $C_0/8$  dans un tampon 0,1 x PBS pH 7,  $C_0$  ayant la valeur indiquée pour les mesures de la figure 8A. Les conditions de mesure sont les suivantes :  $U_{SD} = 1$  V,  $I_D = 100$   $\mu$ A, et une concentration de 0,01 mM pour KCl. Ces mesures montrent qu'il n'y a pas avantage dans les conditions expérimentales choisies d'augmenter la concentration au-delà de  $C_0$ .

Les figures 9A à 9D montrent la détection électronique d'ADN. Les tensions  $U_{SG}$  et les variations  $\Delta U_{SG}$  de la tension  $U_{SG}$  correspondent à un point de fonctionnement  $U_{SD} = 1$  V,  $I_D = 100$   $\mu$ A, et à une concentration 0,01 mM en KCl. Elles sont obtenues à partir de la caractéristique  $I_D(U_{SG}, U_{SD})$  et sont reportées sur les courbes avec en abscisse le numéro des transistors FET (1 à 96).

Les étoiles représentent la mesure avant traitement de surface initial à la soude tel qu'indiqué ci-dessus en liaison avec la figure 6. Les

cercles représentent la mesure après incubation de poly-L-lysine sur tout le réseau. Pour permettre une immobilisation de l'ADN, on incube le réseau de transistors FET pendant 30 minutes dans une dilution de poly-L-lysine (concentration  $C_0$ ). Ensuite, sans effectuer de séchage préalable, on rince à l'eau et on sèche ensuite à l'air. L'incubation conduit à des décalages de la tension  $U_{SG}$  d'une valeur de  $97 \pm 50$  mV (statistique sur 67 surfaces préparées) qui réduisent les variations entre transistors dans le signal électronique. Ces décalages sont compatibles à celles observées avec les valeurs mesurées en relation avec la figure 8C sur des dépôts locaux à la même concentration. Les carrés représentent les mesures après dépôt local d'oligonucléotides (5' Cy-5 modifiés 20 mer, concentration 50  $\mu$ M dans de l'eau désionisée) autour des transistors n° 30, 60 et 90. En niveau de gris et au dessus de la figure 9A, est représentée l'image en microfluorescence des trois points d'ADN précités.

La figure 9B montre la détection électronique et par fluorescence d'oligonucléotides Cy5 modifiés. Les points représentés par des étoiles ont été obtenus par différence  $\Delta U_{SG}$  entre deux mesures électroniques réalisées avant et après 4 dépôts locaux avec des concentrations différentes en ADN (Ref. = 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M). Ils montrent la variation  $\Delta U_{SG}$  de la tension  $U_{SG}$  qui est observée dans les caractéristiques des transistors et qui est due aux dépôts locaux d'ADN. Les carrés montrent l'intensité de la fluorescence mesurée sur les transistors FET séchés, une fois la mesure électronique réalisée avec l'électrolyte. On notera que la même détection électronique est obtenue avec des oligonucléotides du même type, mais non modifiés.

La figure 9C montre la détection d'ADN double-brin après dépôt macroscopique de deux produits sur deux zones A et B des transistors FET. Avec une micropipette, on dépose 0,15  $\mu$ l prélevés dans deux tubes A et B sur deux régions respectives du réseau de transistors à effet de champ FET. Le réseau a été préalablement recouvert de poly-L-lysine pour immobiliser l'ADN et mesuré pour servir de référence. La zone A (transistors 1 à 20) de la figure 9C a été recouverte de la solution du tube A et la zone B (transistors 50 à 90) de la solution du tube B en laissant subsister entre elles une région centrale (transistors 21 à 49) non recouverte. On incube pendant 15 minutes sans sécher, puis on rince à l'eau et on mesure ensuite les transistors du réseau. Les transistors 1 à 20 (zone A) ont été incubés avec

une solution contenant des produits d'une réaction par polymérisation en chaîne (PCR) obtenus dans le tube A selon la procédure décrite ci-après. On constate dans cette zone un décalage vers le bas par rapport à la zone B (transistors 50 à 90) et par rapport à ladite zone non incubée entre A et B. En effet, la solution de référence mise en œuvre dans la zone B a été choisie pour ne pas produire de l'ADN double brin (tube B selon la procédure décrite ci-après).

A la figure 9D, dans la région MUT (transistors 1 à 35) sur laquelle a été déposée une solution obtenue par amplification PCR dans des conditions décrites ci-après, à partir d'ADN portant une mutation, on observe un décalage vers le bas de  $\Delta U_{se}$ , alors que dans la région de référence WT, pour laquelle l'ADN de départ ne portant pas la mutation, on n'observe pas un tel décalage.

Pour l'expérience de la figure 9C, la technique d'amplification PCR d'un fragment d'ADN à 1009 paires de bases met en œuvre l'ADN du bactériophage  $\lambda$  digéré par l'enzyme BstEII en utilisant deux amorces :

5' – CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC

et 5' – CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT .

Le protocole PCR est conduit sur un thermocycleur du commerce :

- initiation pendant 3 minutes à 94 °C
- 30 cycles de dénaturation / hybridation / extension de 30 secondes à 94°C/30 secondes à 57°C / et 2 minutes à 72°C.

Une étape finale de PCR est conduite pendant 3 minutes à 72°C.

Pour un volume de 50 microlitres, on utilise 10 nanogrammes de l'ADN  $\lambda$  digéré par Bst EII, 20 picomoles pour chacune des amorces, et les quatre dNTP ont une concentration finale de 50  $\mu$ M chaque. On met 0,5 microlitres de polymérase TAQ (à 1U/  $\mu$ l) de Roche Diagnostics dans le tampon standard de réaction PCR (fourni avec la polymérase TAQ). Ceci correspond à la préparation du tube A pour la zone A. Dans le tube de référence B (qui correspond à la zone B), on remplace un des quatre dNTP, à savoir le dTTP par du dCTP, de manière à conserver la même concentration totale en dNTP, ce qui inhibe la synthèse du produit d'ADN double brin.

Les produits de la PCR sont, dans l'un et l'autre cas, purifiés deux fois sur des colonnes "QIAQUICK" de la Société QIAGEN et éluées avec un tampon de Tris-Cl de pH 8,5 à une concentration de 10 mM.

L'amplification PCR spécifique de la mutation mise en œuvre dans le cadre de l'expérience correspondant à la figure 9D part d'un fragment du gène humain CX-26 (code d'accès M 86849, chromosome 13q11-12). Ce gène est amplifié à partir d'ADN génomique provenant d'un ou plusieurs patients. La technique de PCR met en œuvre des conditions et des amorces de cyclage décrites dans les articles de F. DENOYELLE et collaborateurs utilisés pour le premier "Prelingual Deafness : high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene" paru dans Human Molecular Genetics, 1997, vol. 6, n° 12, p. 2173 à 2177 et pour le deuxième "Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect : implications for genetic counselling" paru dans THE LANCET, vol. 353, 17 Avril 1999, p. 1298 à 1303. On utilise une polymérase Pwo (de Roche Diagnostics) dans un tampon PCR avec  $MgSO_4$  à 1,5 mM. Les amorces sont le GAP1F et CONNR (voir le deuxième article précité de F. DENOYELLE, p. 1299 colonne de droite avant dernier paragraphe) et les conditions expérimentales sont celles du premier article précité du même auteur (p. 2177). On utilise une concentration finale de 0,6  $\mu M$  pour chacune des amorces et de 0,2 mM pour chacun des dNTP.

Les produits de la PCR sont purifiés sur des colonnes "QIAQUICK" de la Société QIAGEN, et après une dilution (de 10 000 fois) servent d'ADN de départ dans la réaction spécifique de la mutation qui a lieu ensuite.

L'amplification PCR est choisie pour permettre la détection de la mutation 35delG (ou 30delG) dans le gène CX26, grâce à des amorces spécifiques de cette mutation. Les conditions de cycle et les séquences des amorces sont données dans l'article de G. LUCOTTE et collaborateurs intitulé "PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France" publié dans Molecular and Cellular Probes (2001) 15, p. 57 à 59. On utilise 20 picomoles de chacun des oligonucléotides amorce pour un volume final de 50  $\mu l$ .

Les deux amorces spécifiques de la mutation (voir article de LUCOTTE précité, page 58, colonne de droite M primer et N primer) et une

amorce commune (C primer) sont utilisées pour synthétiser les produits de PCR de 197 paires de bases. On réalise deux réactions PCR spécifiques sur chaque échantillon d'ADN, la première de ces réactions est réalisée avec la première amorce spécifique et donne un produit si la mutation est présente dans l'ADN de départ. La deuxième réaction est réalisée avec la deuxième amorce spécifique et donne un produit si la mutation n'est pas présente dans l'ADN de départ. Ceci permet de déterminer si un échantillon est normal, hétérozygote ou homozygote vis-à-vis de cette mutation.

Pour un volume de 50  $\mu$ l de milieu réactif, dans un tampon PCR standard, on utilise un microlitre d'ADN provenant de la préamplification décrite ci-dessus, 30 picomoles de chacune des amorces, des dTNP à une teneur 100  $\mu$ M et 1 microlitre de polymérase TAQ (1U/  $\mu$ l) de Roche Diagnosis. Les produits de PCR sont purifiés deux fois sur des colonnes "QIAQUICK" de la Société QIAGEN, et éluées avec un tampon Tris-Cl à 10 mM de pH 8,5. Pour les tube WT et MUT, on a utilisé la même paire d'amorces : C-primer et M-primer. La seule différence est l'ADN de départ.

Les figures 10A et 10B montrent un circuit intégré présentant des transistors T arrangés selon une ligne (ou plusieurs lignes). Deux canaux microfluidiques (par exemple parallèles)  $C_1$  et  $C_2$  d'un substrat 30 permettent de mettre un ou plusieurs transistors T à effet de champ en contact avec la solution qui circule dans un canal  $C_1$  et/ou  $C_2$ . Le matériau d'un substrat 30 qui comporte les canaux microfluidiques (ou capillaires) peut être un polymère PDMS (polydiméthylsiloxane) ou autre, un verre, du silicium, etc...

Il est ainsi possible de réaliser des mesures différentielles à partir de deux solutions qui circulent dans les deux canaux  $C_1$  et  $C_2$ . Il est également possible de réaliser sur un même substrat 30 un grand nombre de tels micro-canaux fluidiques, le substrat dans lequel ils sont ménagés étant solidarisé au substrat semi-conducteur dans lequel sont intégrés les transistors à effet de champ FET. Il est également possible de mesurer une variation à l'intérieur d'un canal donné. Cette variation peut être au cours du temps. Il est également possible d'injecter différentes solutions à un endroit donné dans un capillaire et le profil des concentrations reste inchangé le long du canal, même loin du point d'injection. On se reportera à l'article de Paul J. A. KENIS et al., intitulé "Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning" paru dans SCIENCE, vol. 285, 2 Juillet 1999, p. 83-85 (notamment figure 1A).

Une technique d'analyse mettant en œuvre la microfluidique est décrite dans l'article "Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system" de Eric T. LAGALLY et collaborateurs paru dans Sensors and Actuators B 63 (2000) p. 138-146.

### REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur des zones actives d'un capteur, caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ ( $T_1$ ,  $T_2$  ...) dont chacun présente une région de source (S), une région de drain (D), ainsi qu'une région de porte qui constitue une dite zone active (3) sur laquelle ledit paramètre représentatif doit être détecté et en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) mettre en contact certaines des dites zones (3) avec des molécules sondes pour réaliser leur fixation,

b) baigner dans une solution d'électrolyte (6) au moins ces zones qui ont été mises en contact avec des molécules sondes,

c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte/tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un premier groupe correspondant à des zones (3) mises en contact avec des molécules sondes pour en déduire au moins un dit paramètre représentatif par comparaison entre au moins deux dites mesures obtenues pour deux différentes zones.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite mesure d'au moins un point de la caractéristique met en œuvre l'application d'une tension donnée ( $U_{DS}$ ) entre le drain et la source d'au moins lesdits deux transistors du premier groupe ainsi que l'application dans un premier cas d'une tension donnée ( $U_{GS}$ ) entre la porte et la source de ces transistors du premier groupe ou, dans un deuxième cas d'un courant de drain ( $I_D$ ) donné à ces transistors du premier groupe,

3. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il présente entre a et b une étape de rinçage.

4. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte après a) et avant b) les étapes suivantes :

a1) rinçage

a2) ajout d'une solution contenant des molécules cibles susceptibles d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes.

5. Procédé selon une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte après c, les étapes suivantes :

d) ajout d'une solution d'électrolyte (6) contenant des molécules cibles susceptibles d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes.

5 e) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension, source-porte / tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un deuxième groupe correspondant à des zones (3) mises en contact avec des molécules sondes et avec des molécules cibles pour obtenir par comparaison au moins un dit paramètre représentatif.

10 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, au point e, la mesure d'au moins un point de la caractéristique met en œuvre l'application d'une tension donnée ( $U_{DS}$ ) entre le drain et la source des transistors d'au moins lesdits deux transistors du deuxième groupe, et l'application dans un premier cas d'une tension donnée ( $U_{GS}$ ) entre la porte et la source de ces transistors du deuxième groupe ou dans un deuxième cas  
15 d'un courant de drain ( $I_D$ ) donné à ces transistors du deuxième groupe,

7. Procédé selon une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il met en œuvre une pluralité de dites mesures d'au moins un point de la caractéristique, qui sont espacées au cours du temps.

20 8. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite comparaison est réalisée par mesure différentielle.

25 9. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la comparaison est réalisée entre des mesures effectuées sur au moins deux transistors correspondant à des zones (3) qui sont baignées par une solution d'électrolyte (6) après avoir été mises en contact avec des molécules sondes.

30 10. Procédé selon une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la comparaison est réalisée entre des mesures effectuées sur au moins un transistor correspondant à une zone (3) qui est baignée par une solution d'électrolyte (6) après avoir été mise en contact avec des molécules sondes en vue de leur fixation et sur au moins un transistor correspondant à une zone qui est baignée par ladite solution d'électrolyte (6) sans avoir été mise en contact avec des molécules sondes.

35 11. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit paramètre représentatif est une détection de la fixation de molécules sondes sur une dite zone (3).



12. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les molécules sondes sont des molécules d'ADN, d'ARN ou de protéines.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que  
5 les molécules sondes sont des molécules d'ADN et en ce que les transistors à effet de champ sont de type à canal n à appauvrissement, avec une polarisation de porte négative.

14. Procédé selon une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il met en œuvre une détection par comparaison entre  
10 deux zones comprenant chacune au moins un dit transistor à effet de champ, la première zone étant baignée par une solution obtenue à partir d'une réaction enzymologique (par exemple amplification PCR) donnant un produit détectable spécifique de la présence ou de l'absence d'une mutation dans un premier échantillon d'ADN et la deuxième zone étant baignée par une solution  
15 obtenue à partir d'une réaction enzymologique (par exemple amplification PCR) donnant un produit d'ADN spécifique de la présence ou de l'absence d'une mutation dans un deuxième échantillon d'ADN.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le premier et le deuxième échantillons d'ADN proviennent de deux patients et  
20 en ce que la réaction enzymologique est la même pour les deux échantillons.

16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le premier et le deuxième échantillons d'ADN sont identiques et proviennent du même patient et en ce que la réaction enzymologique dans la première zone est réalisée dans des conditions expérimentales produisant un produit  
25 d'ADN en l'absence de mutation dans le premier échantillon et en ce que la réaction enzymologique dans la deuxième zone est réalisée dans des conditions expérimentales produisant un produit d'ADN en présence d'une mutation dans le deuxième échantillon.

17. Procédé selon une des revendications précédentes,  
30 caractérisé en ce qu'il comporte la circulation à travers au moins un microcanal fluide d'une solution pour la mettre en contact avec au moins un dit transistor à effet de champ ( $T_1$ ,  $T_2$ , ...).

**PROCEDE DE DETECTION D'AU MOINS UN PARAMETRE  
CARACTERISTIQUE DE MOLECULES SONDES FIXEES SUR AU MOINS  
UNE ZONE ACTIVE D'UN CAPTEUR**

-----

**ABREGE DESCRIPTIF**

-----

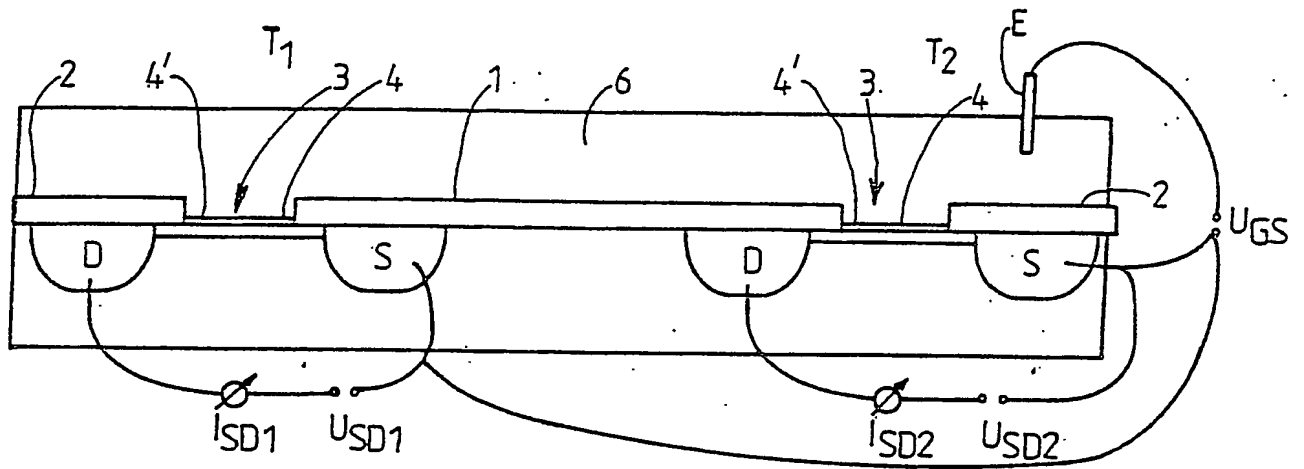
L'invention concerne un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur des zones actives (3) d'un capteur. Il est caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ ( $T_1$ ,  $T_2$  ...) dont chacun présente une région de source (S), une région de drain (D), ainsi qu'une région de porte qui constitue une dite zone active (3) sur laquelle ledit paramètre représentatif doit être détecté et en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

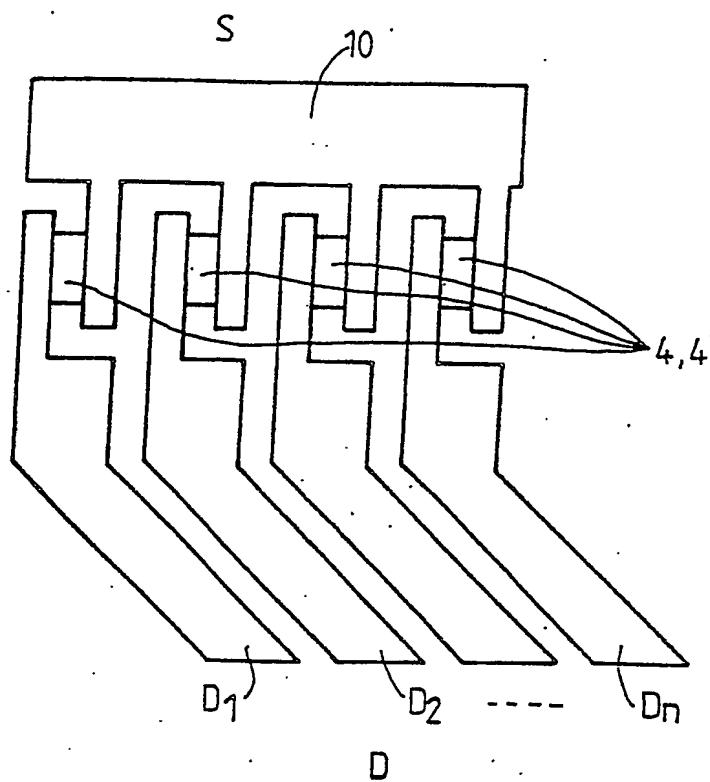
a) mettre en contact certaines desdites zones (3) avec des molécules sondes pour réaliser leur fixation,

b) baigner dans une solution d'électrolyte (6) au moins ces zones qui ont été mises en contact avec des molécules sondes,

c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte/tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un premier groupe correspondant à des zones (3) mises en contact avec des molécules sondes pour en déduire au moins un dit paramètre représentatif par comparaison entre au moins deux dites mesures obtenues pour deux différentes zones (3).

FIGURE 1.

FIG.1

FIG. 2

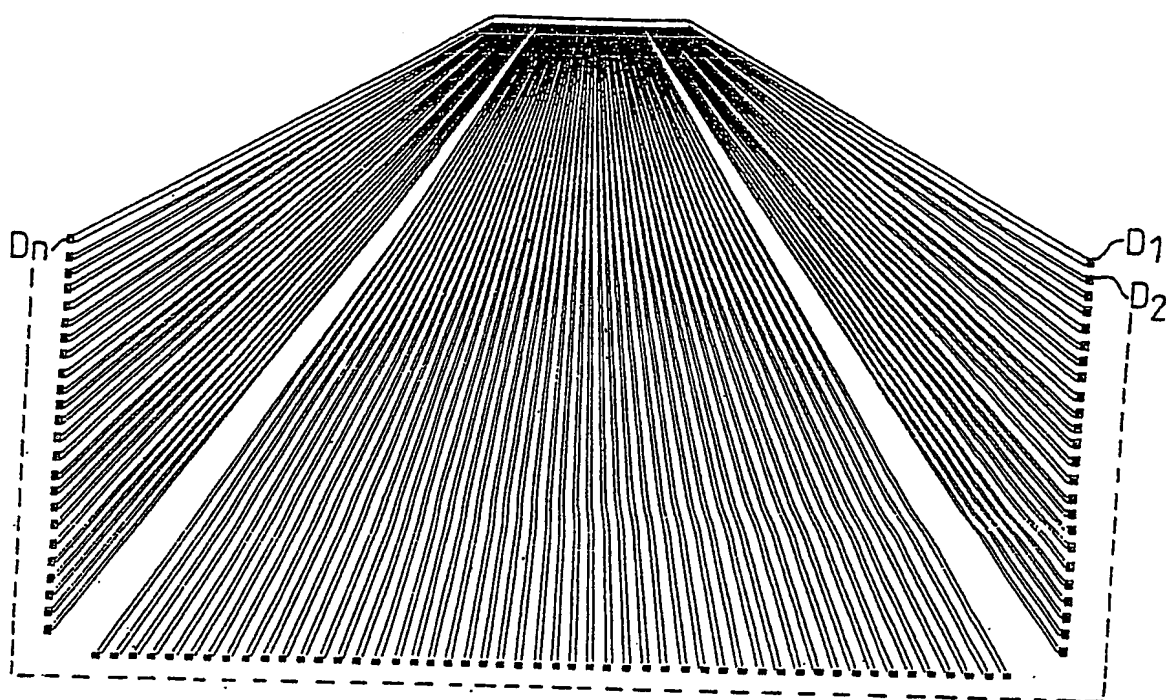
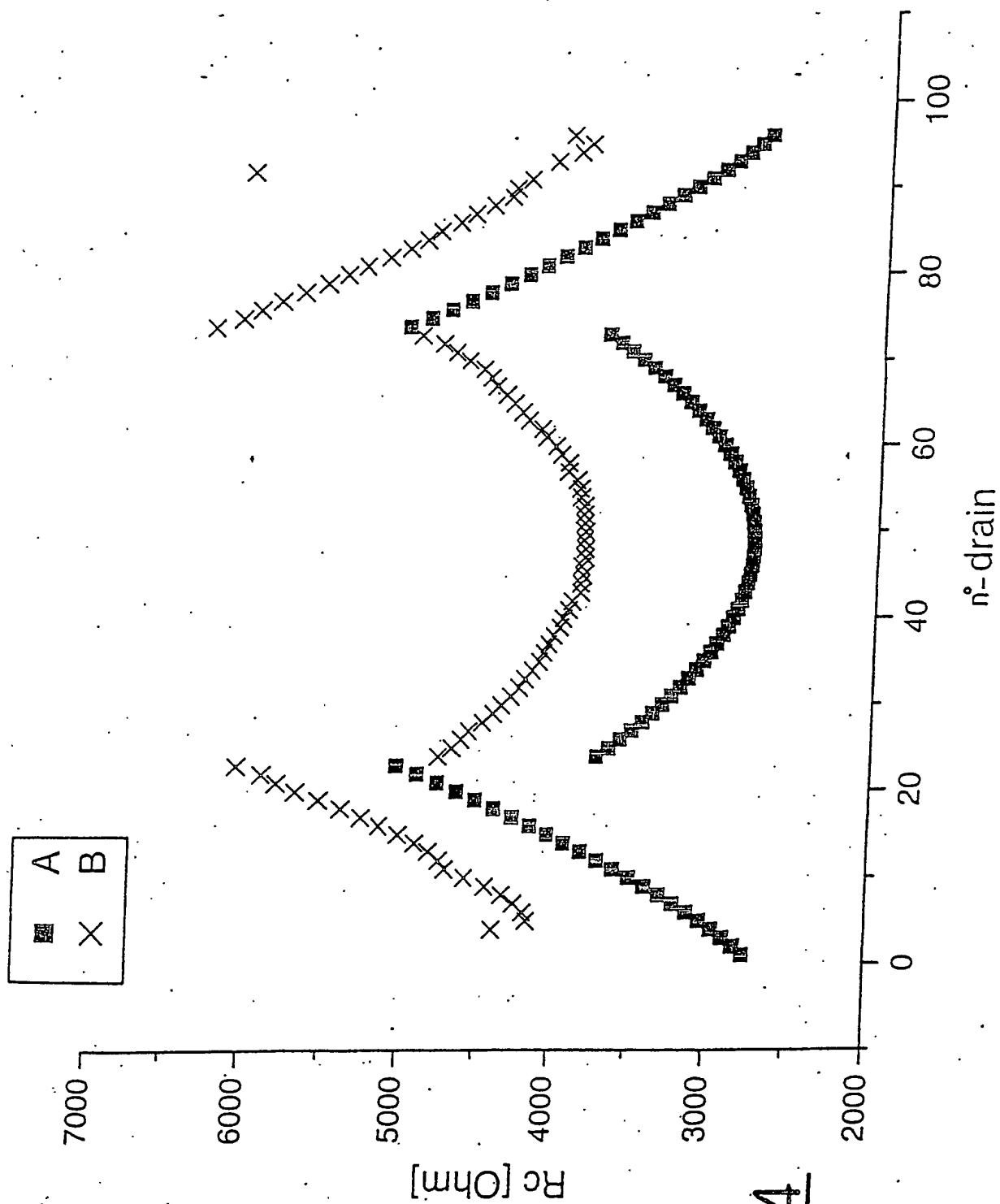
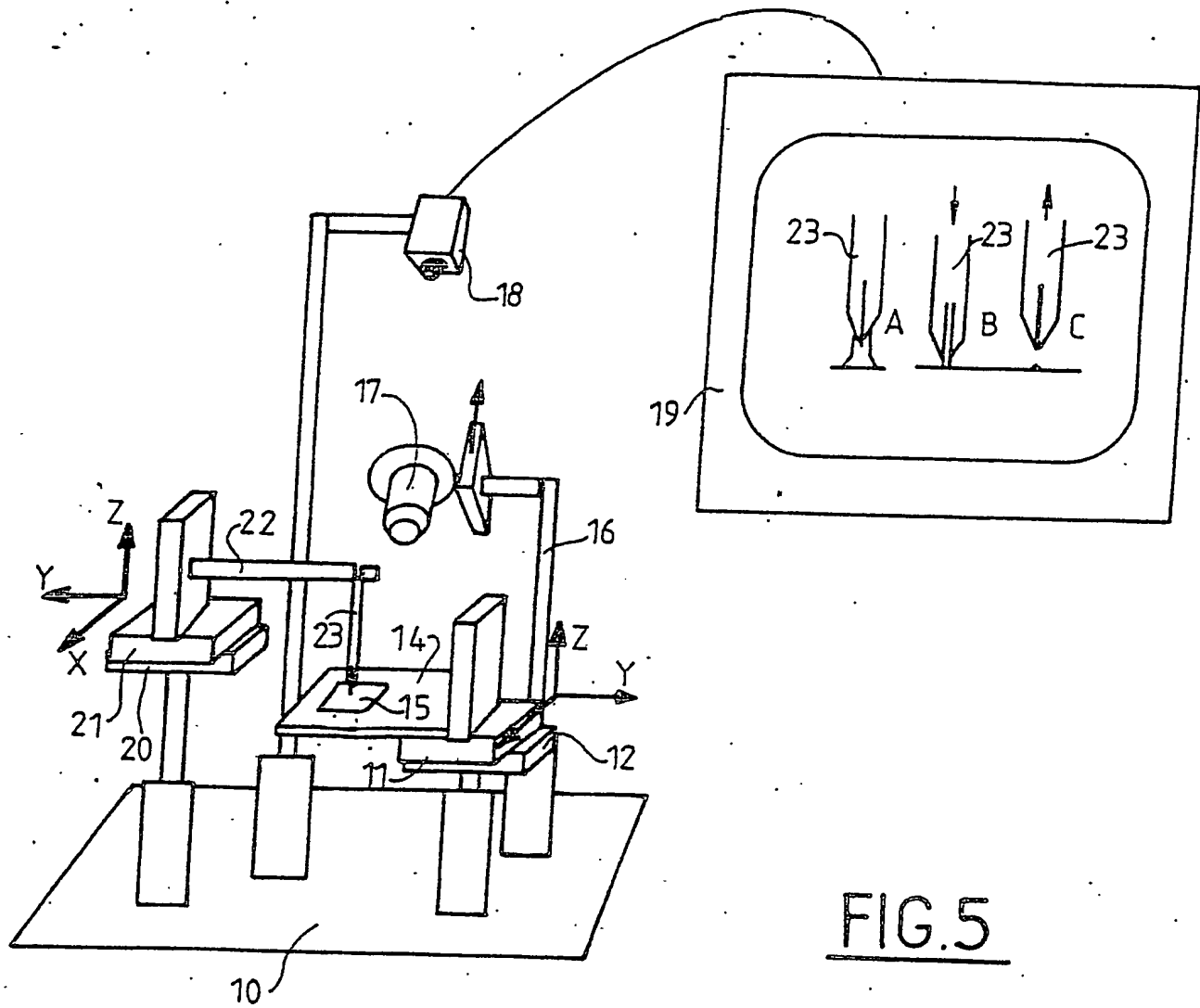


FIG. 3

4/12





6/12

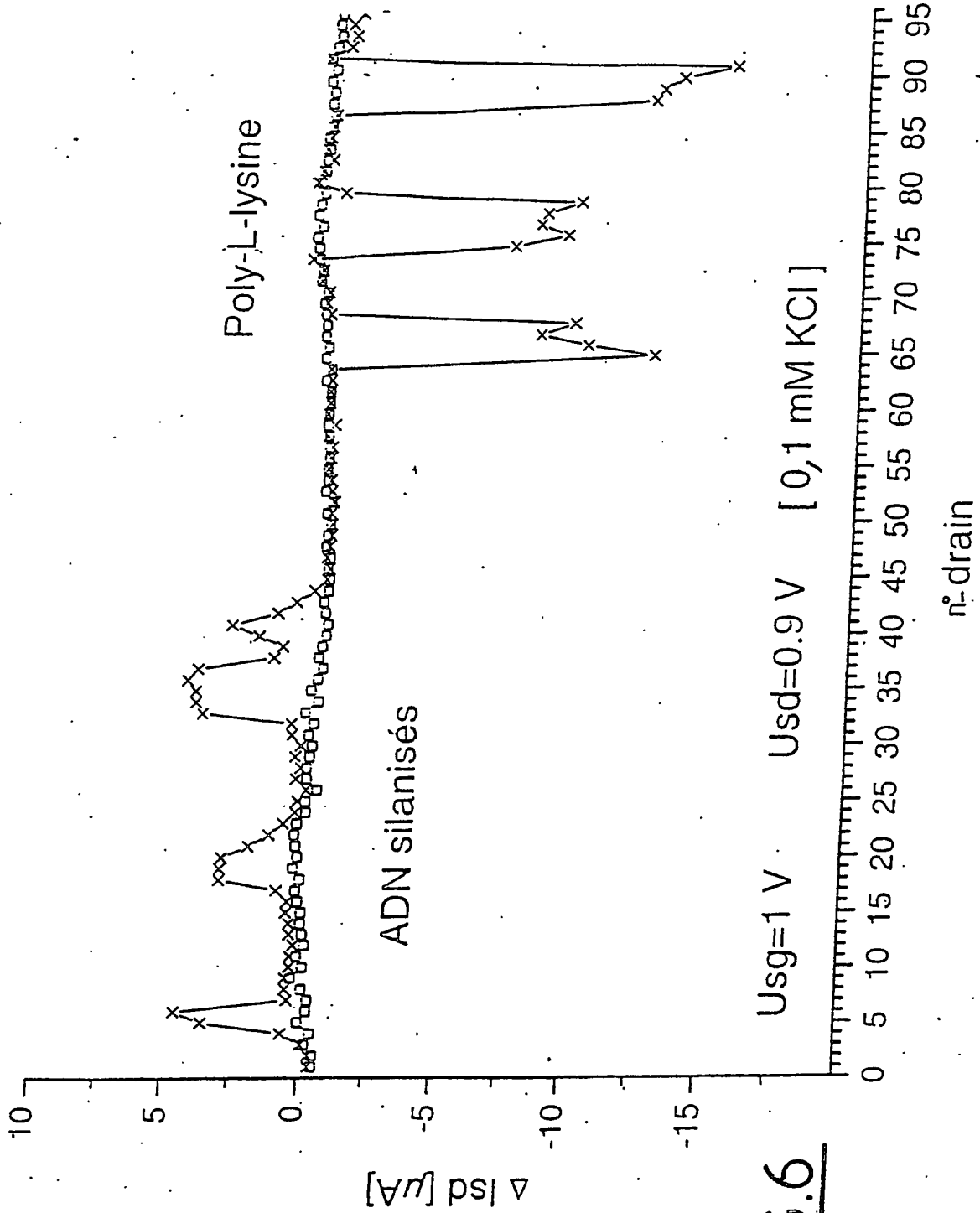
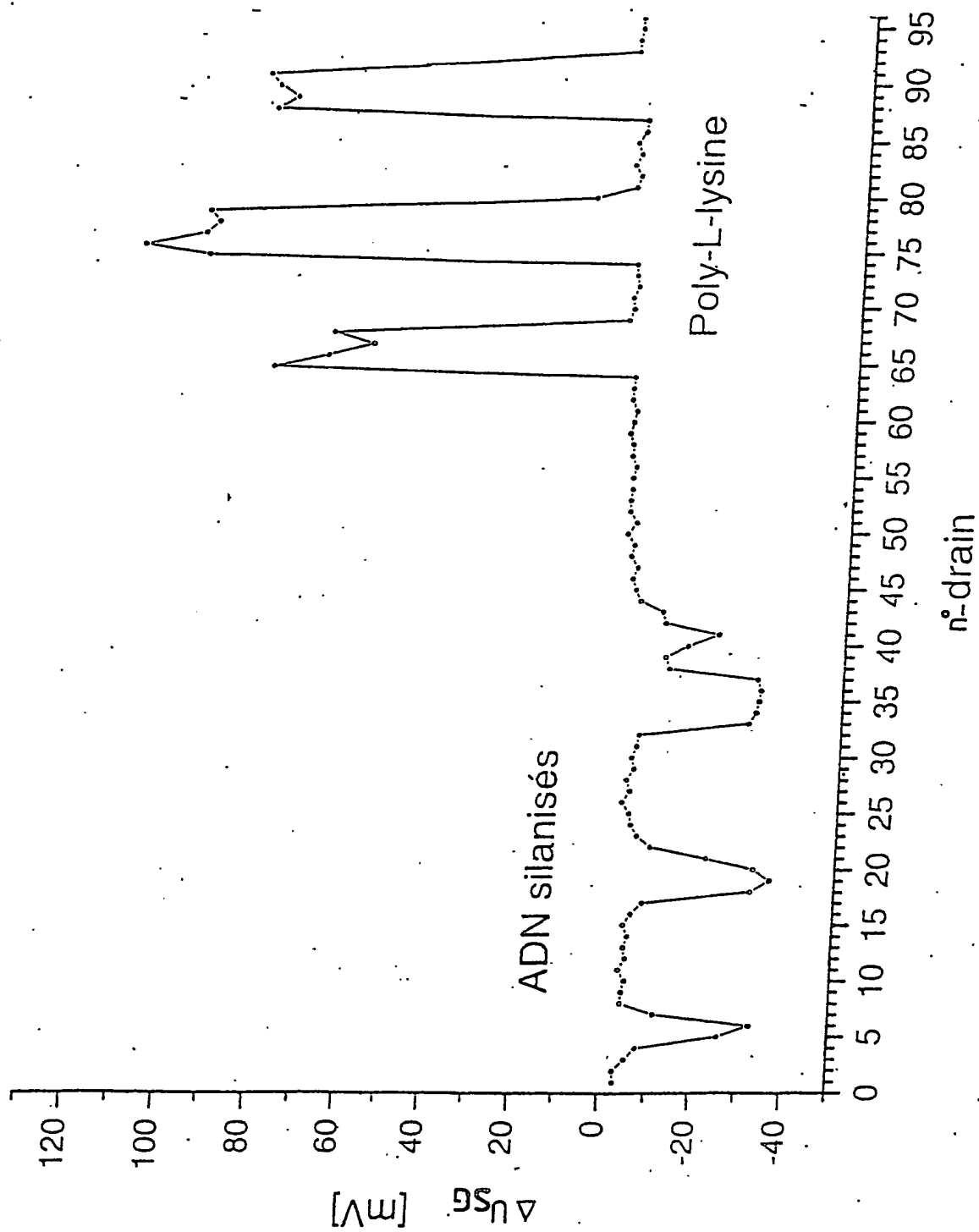


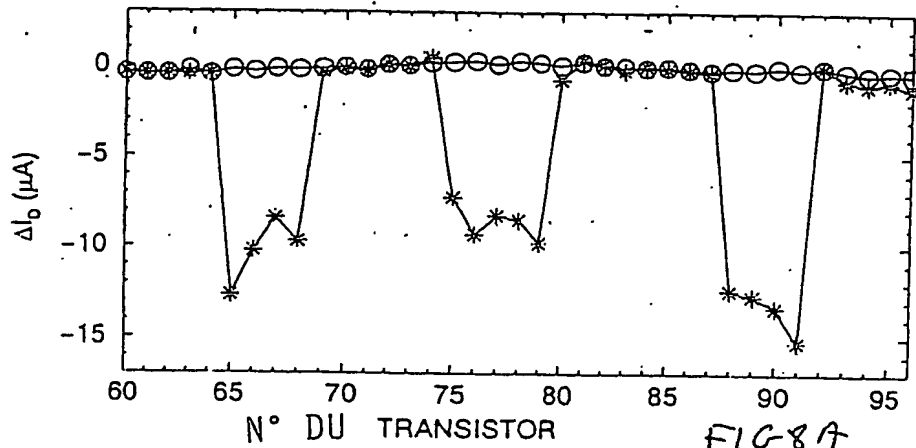
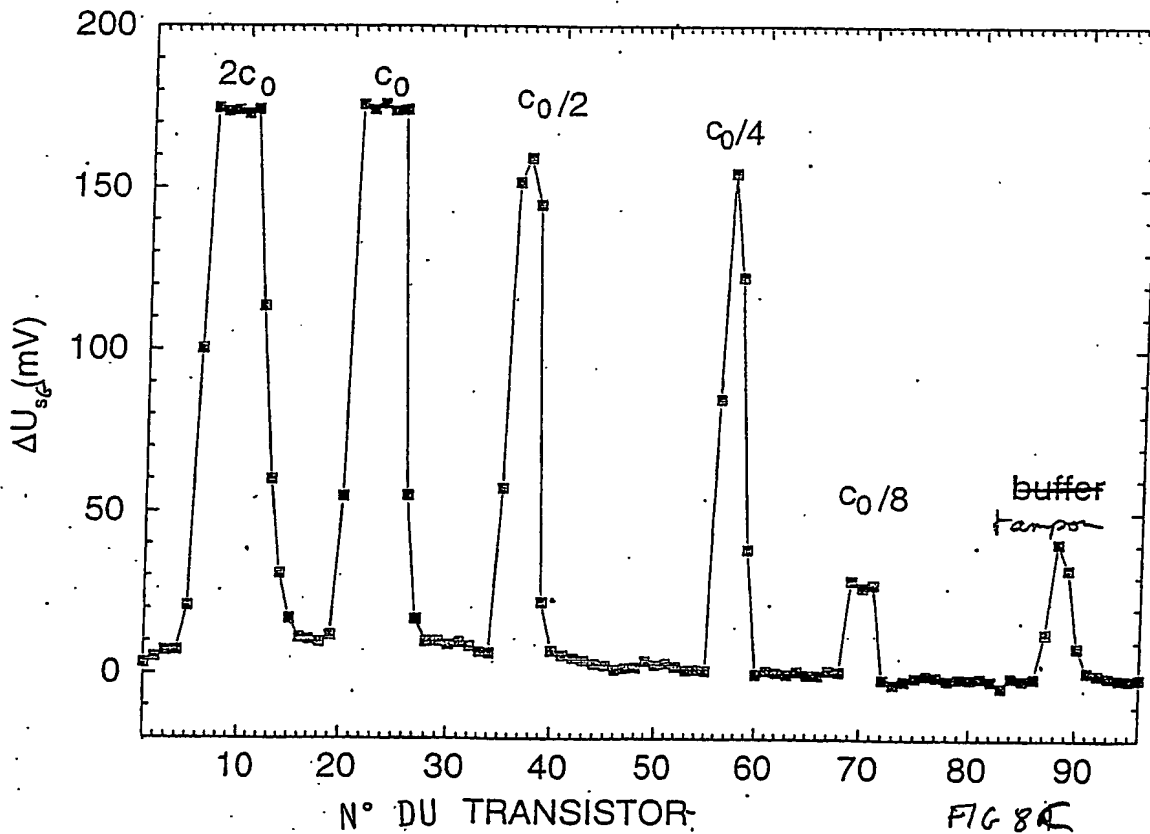
FIG.6



7/12

FIG.7

8/12

FIG 8AFIG 8C

9/12

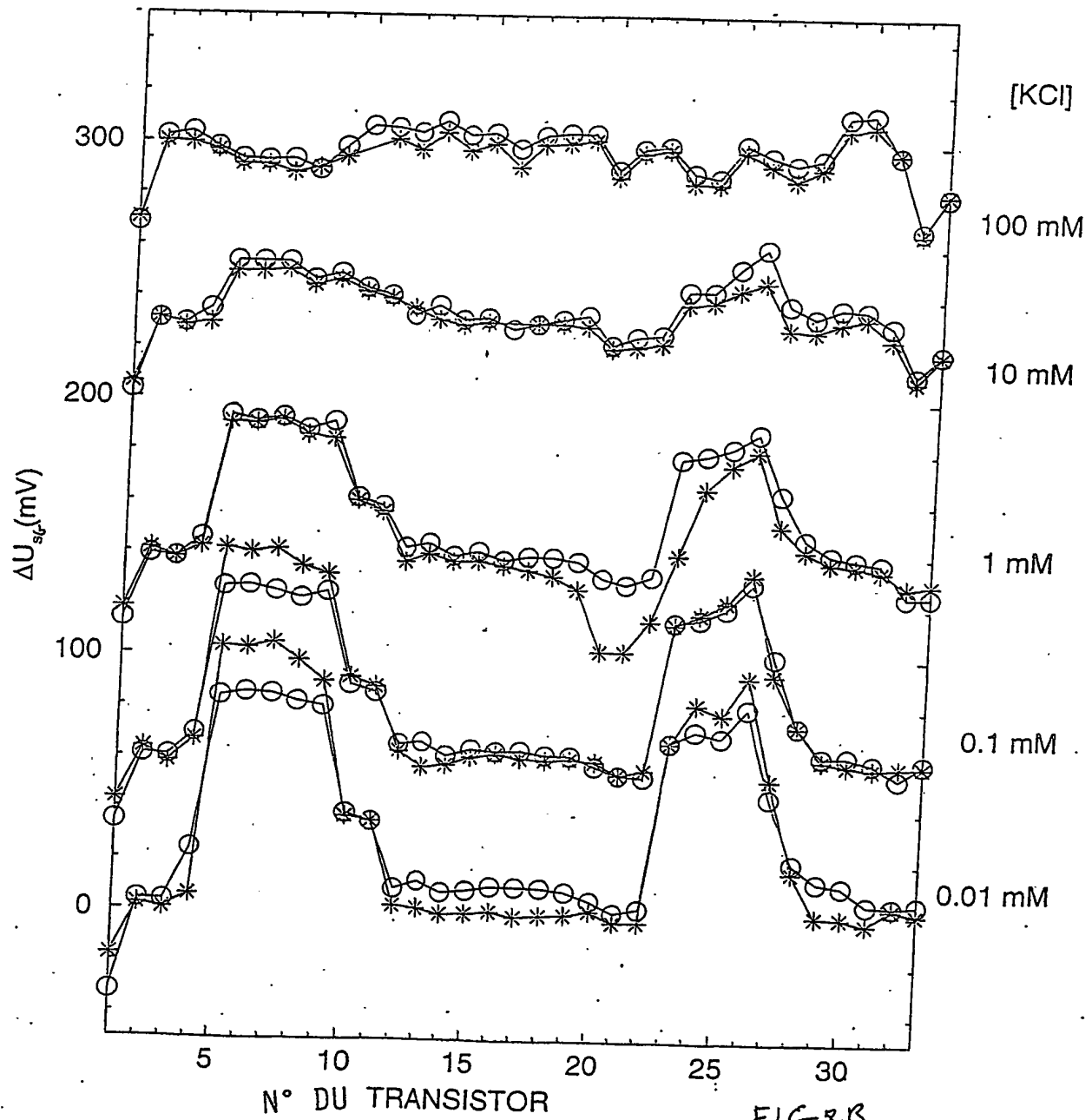
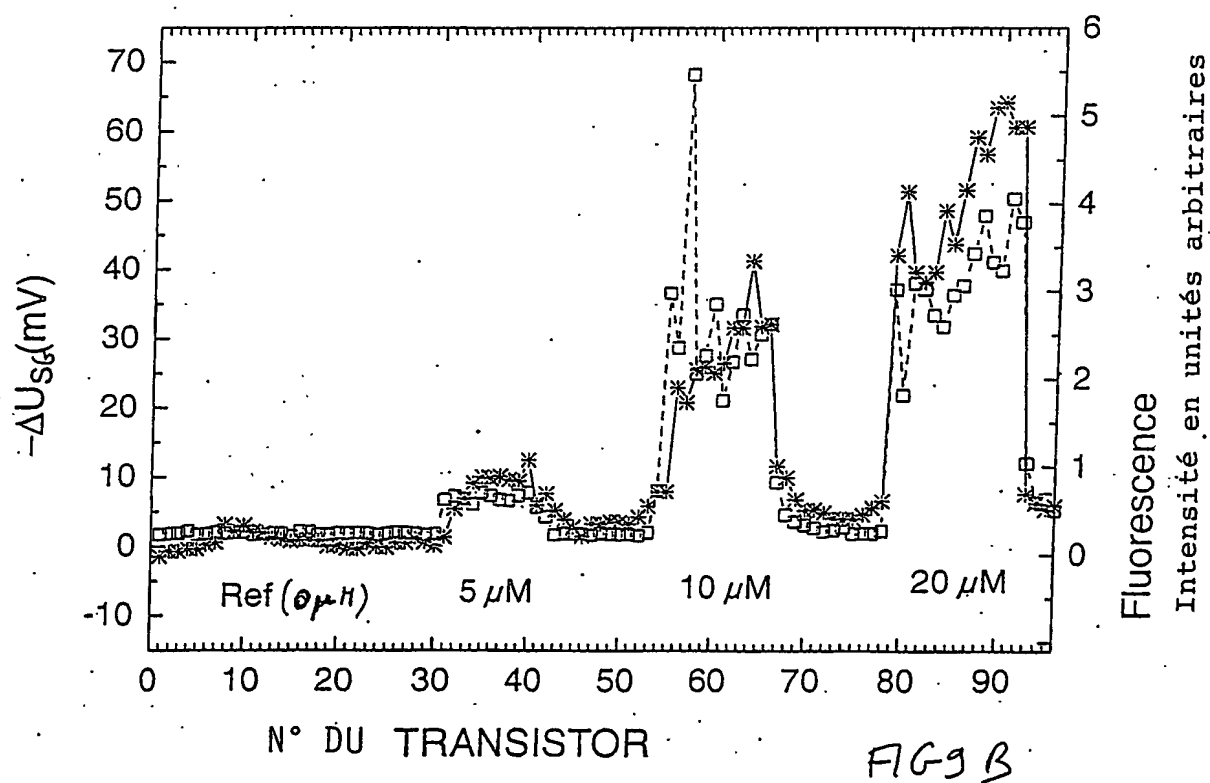
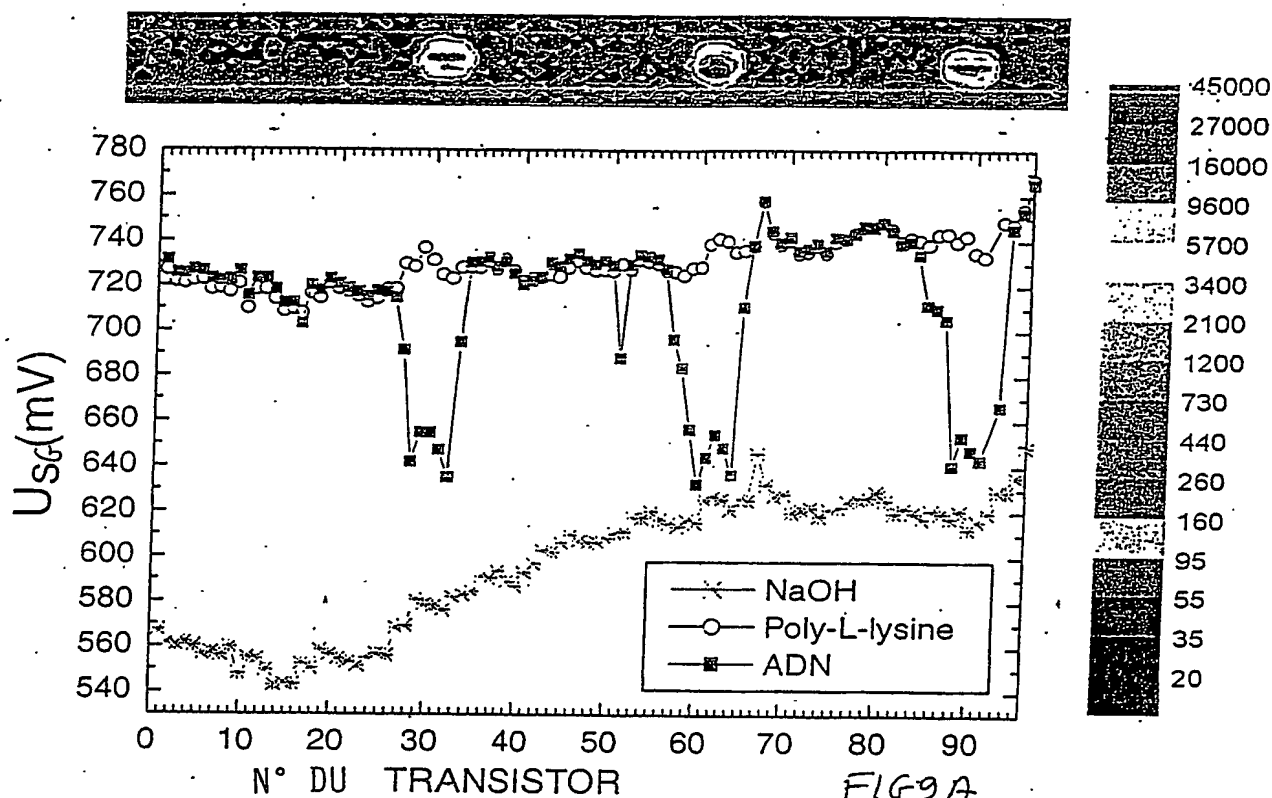
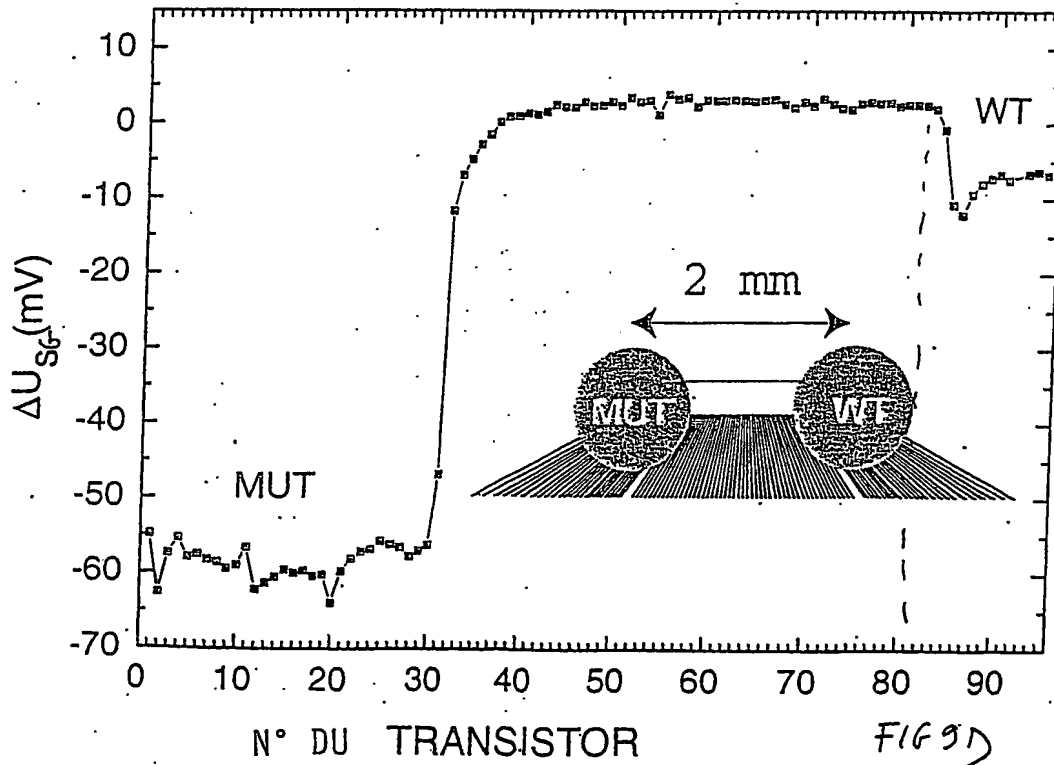
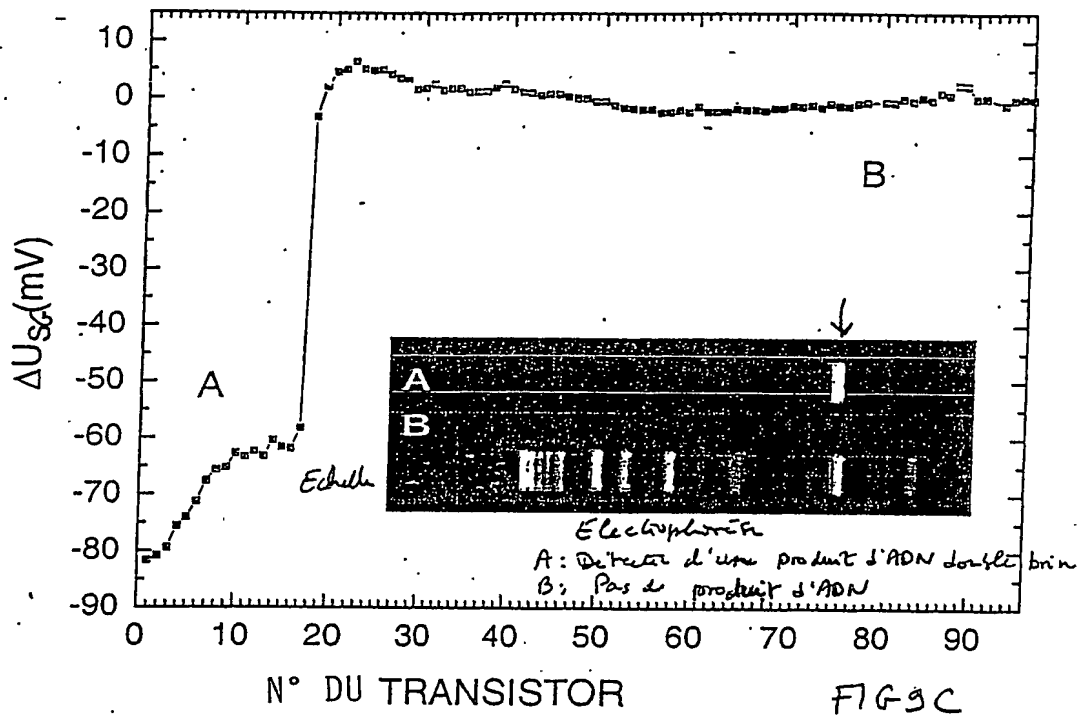


FIG-8.B

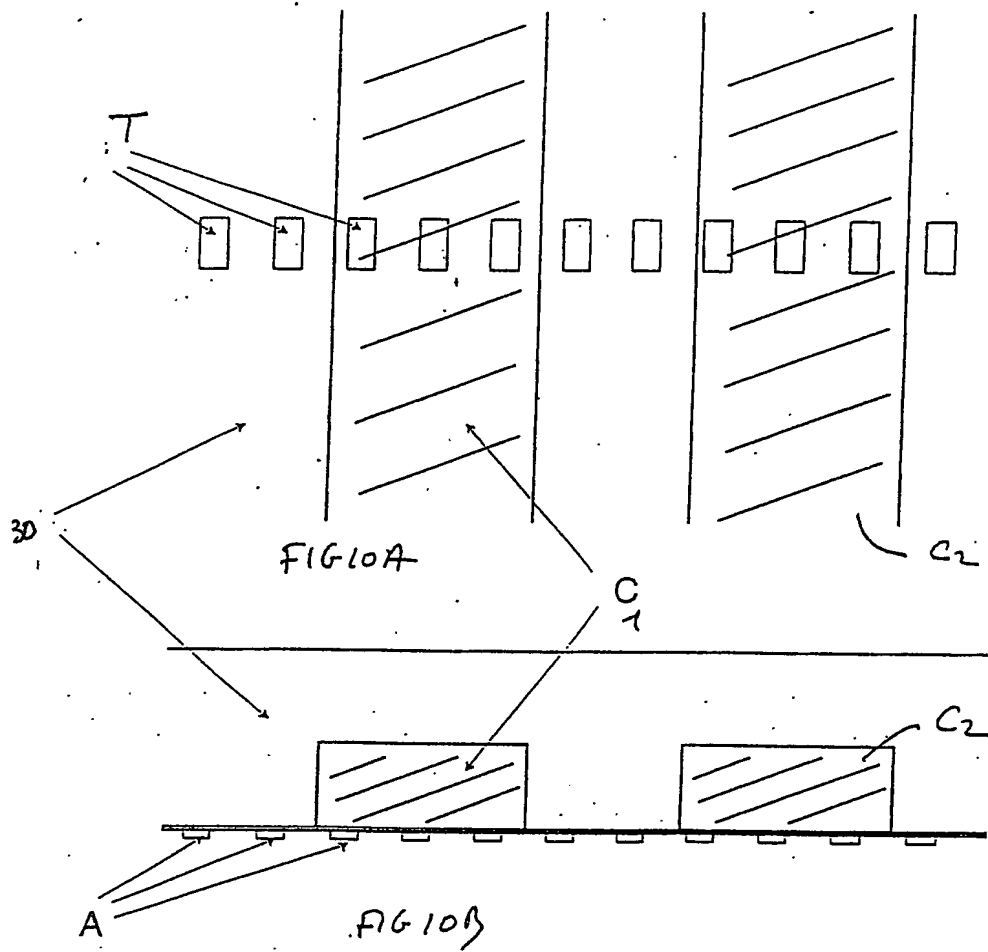
10/12



11/12



12/12



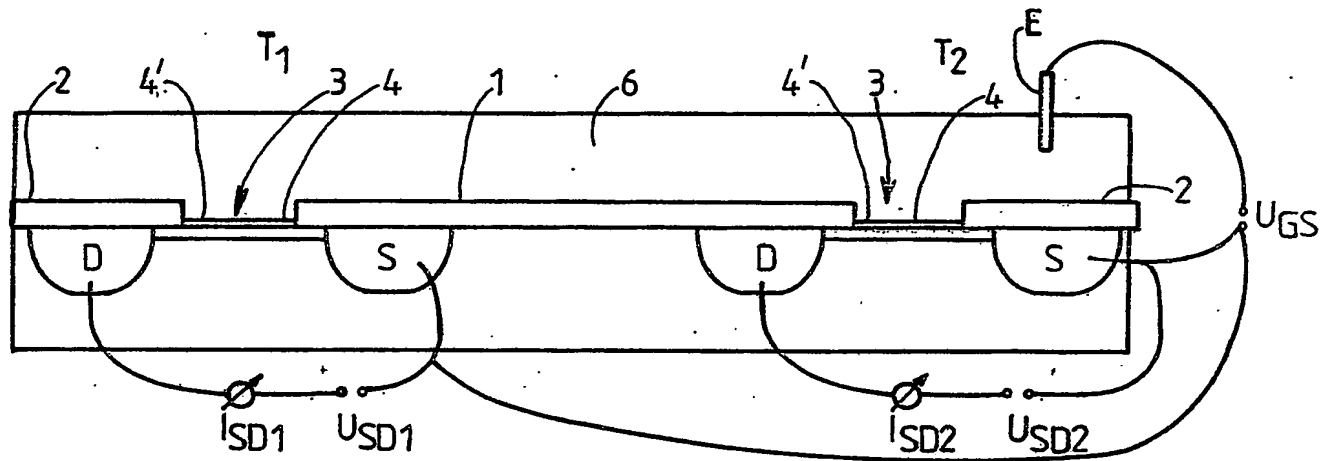
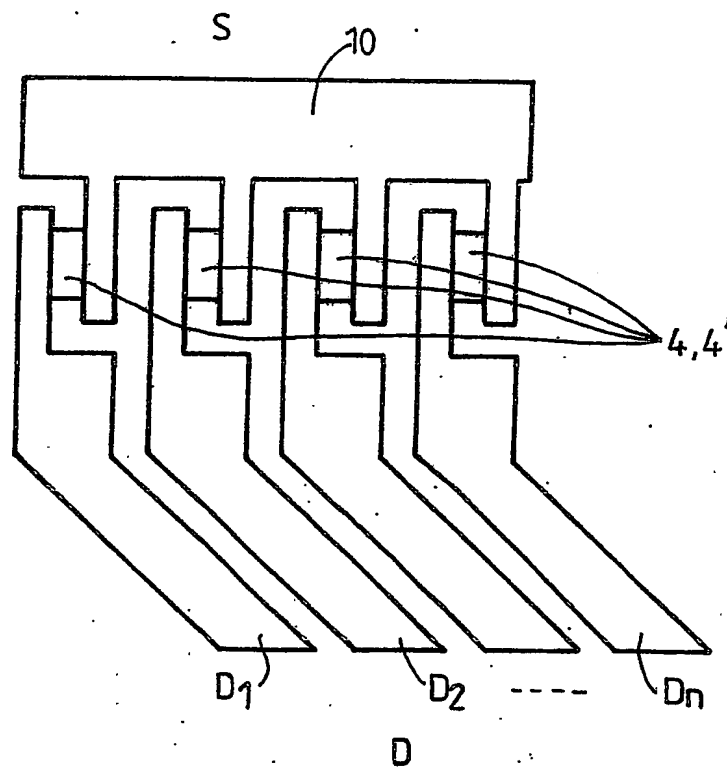
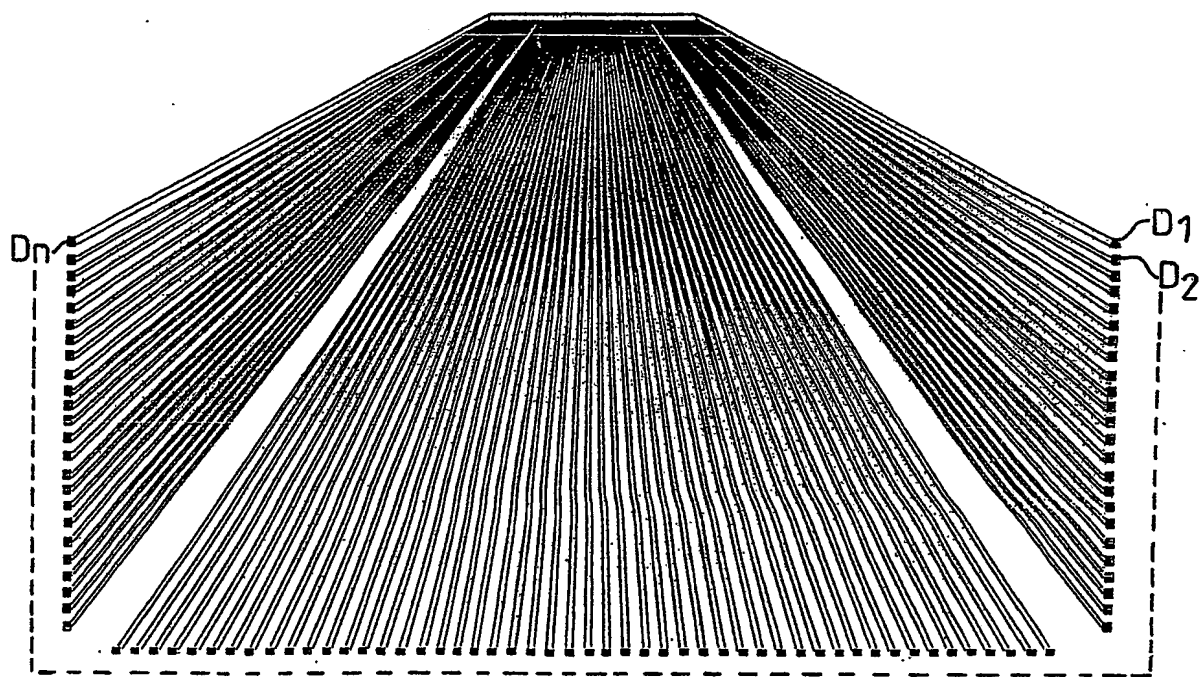


FIG. 1

FIG. 2



3/12

FIG. 3

4 / 12

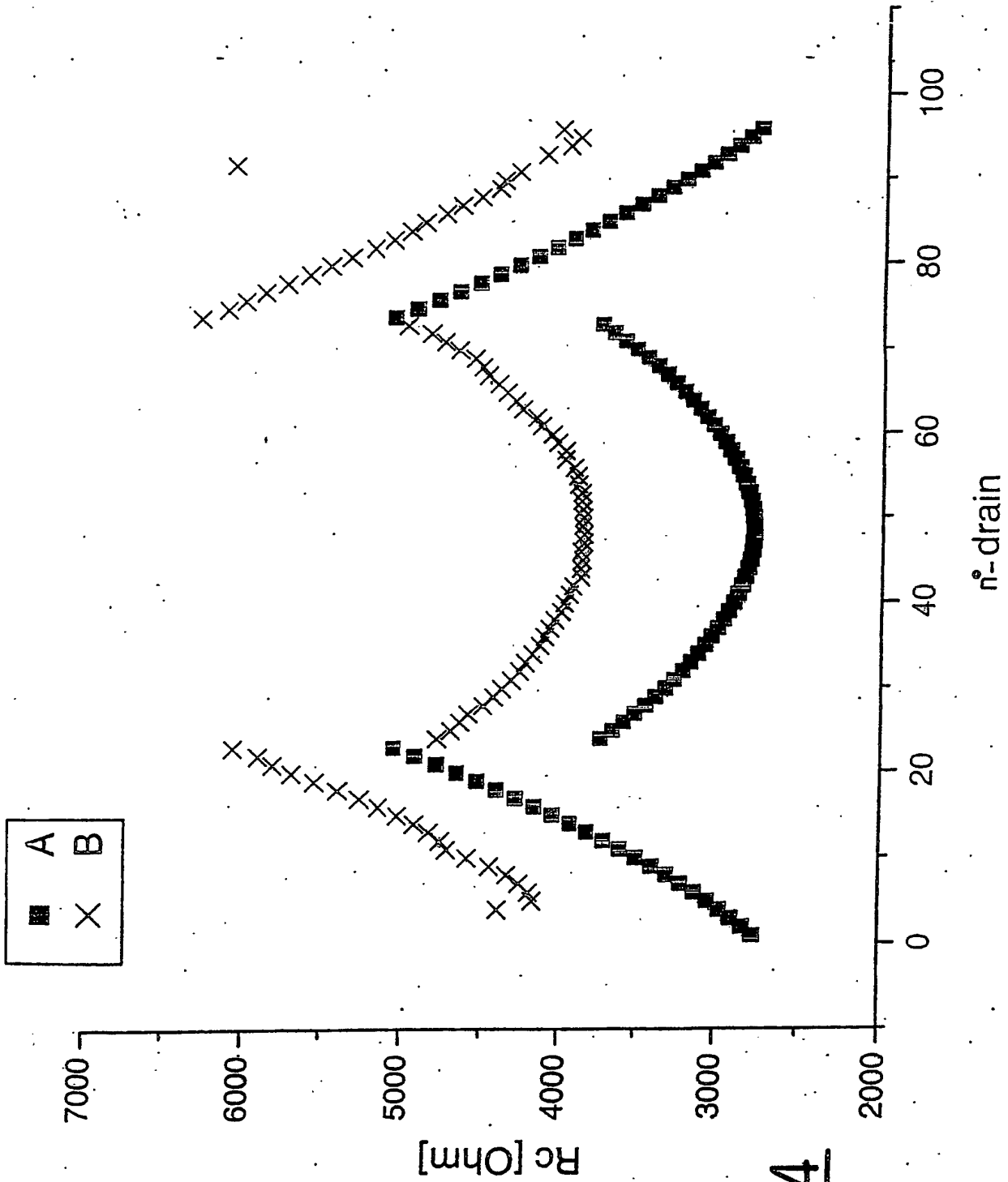
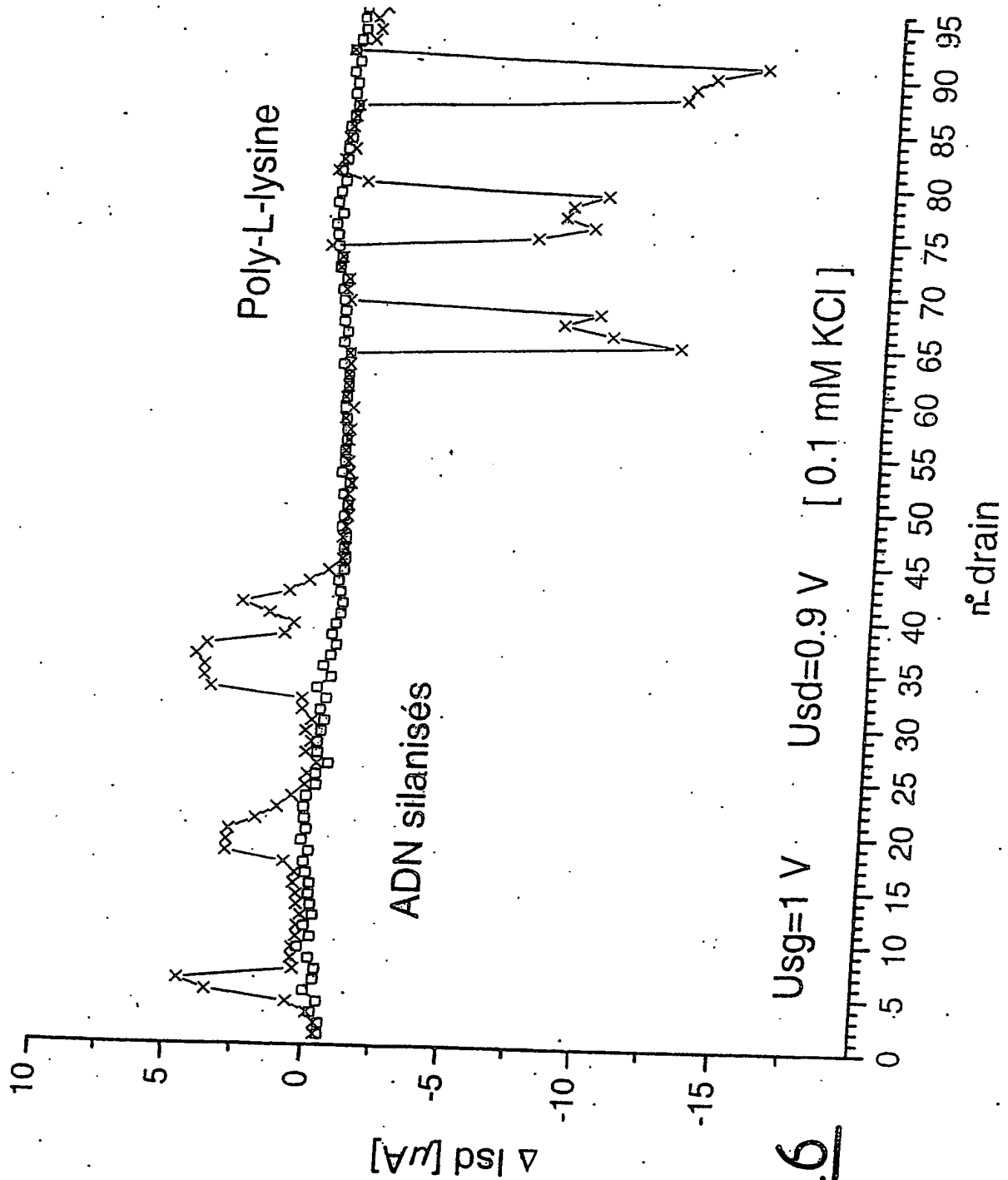


FIG.4



6 / 12



**FIG.6**

14/03/02

7/12

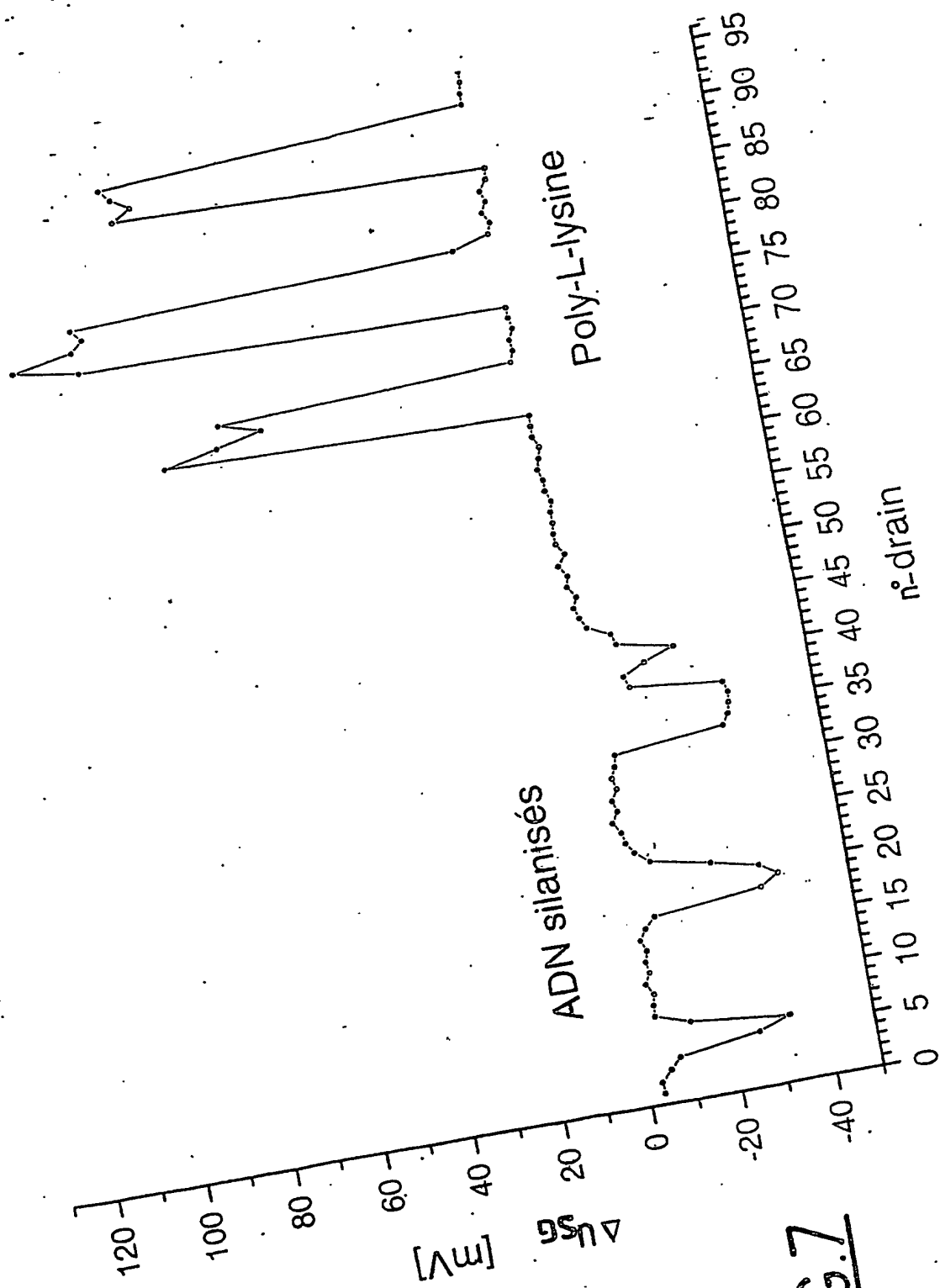


FIG.7

8/12

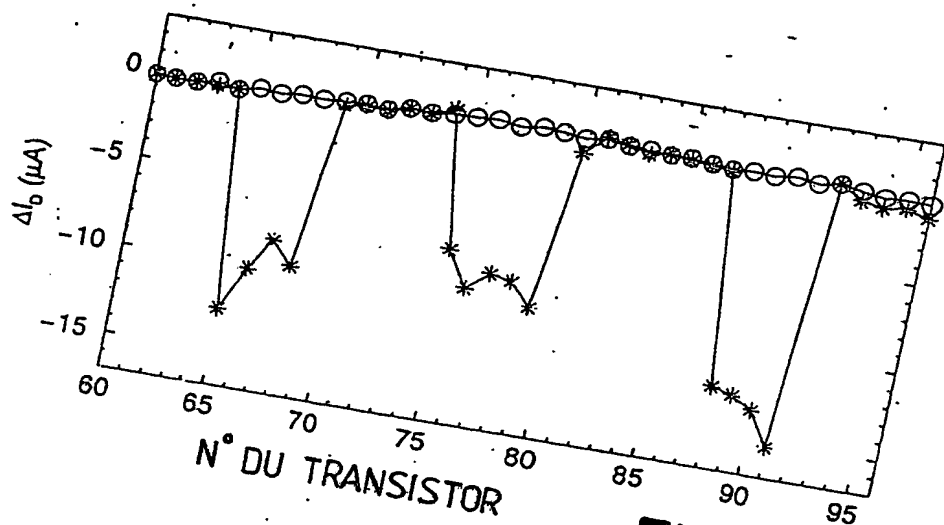
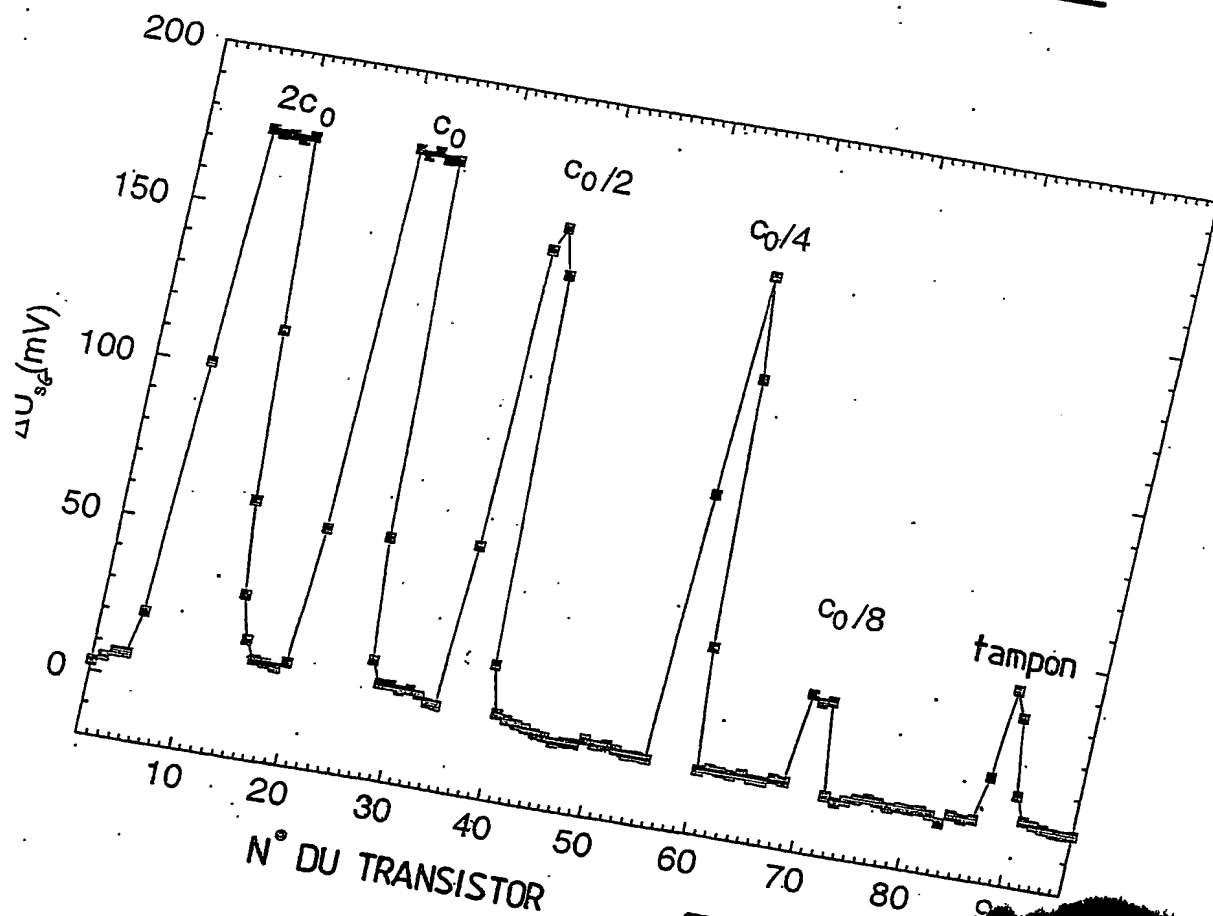
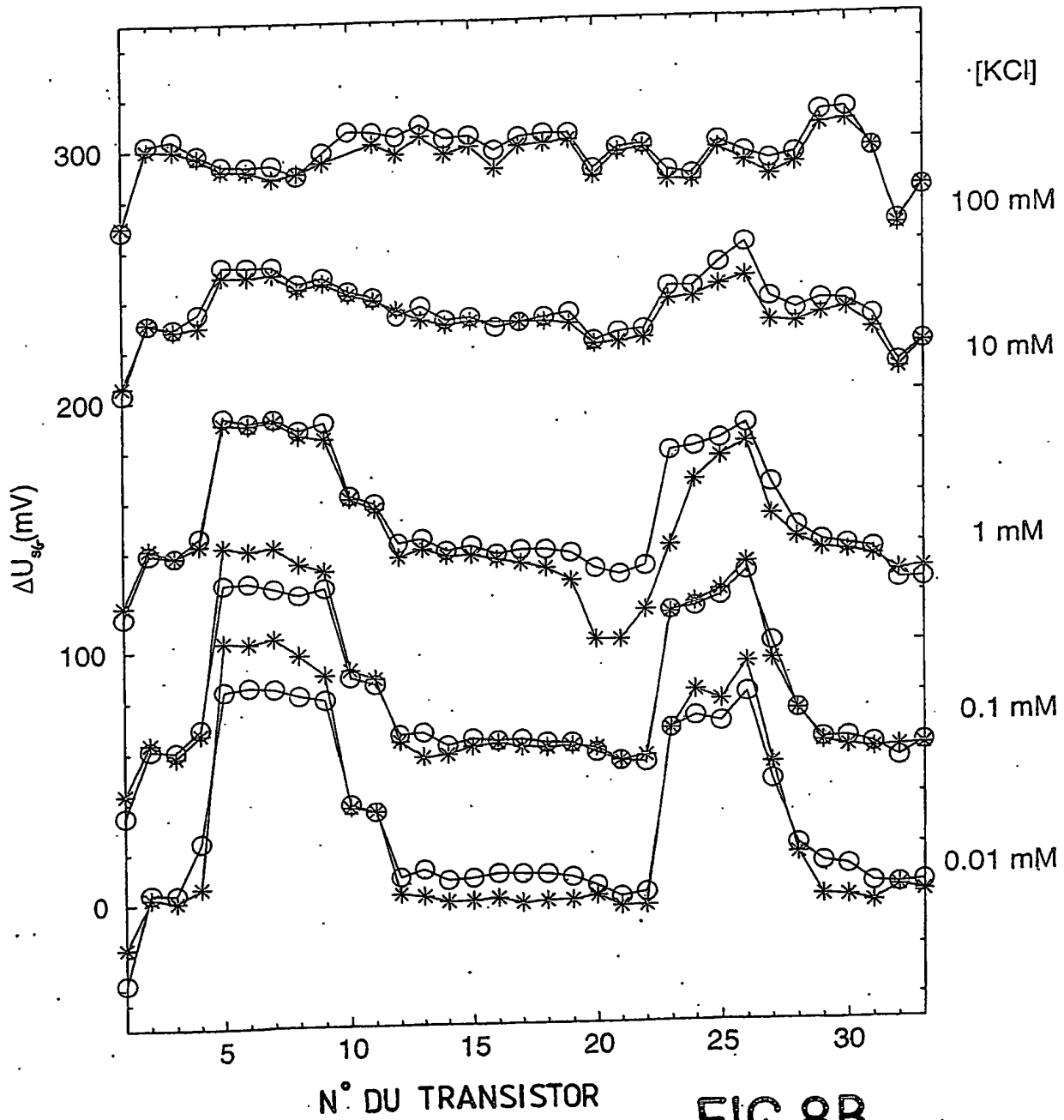


FIG. 8A



9/12

**FIG.8B**

10/12

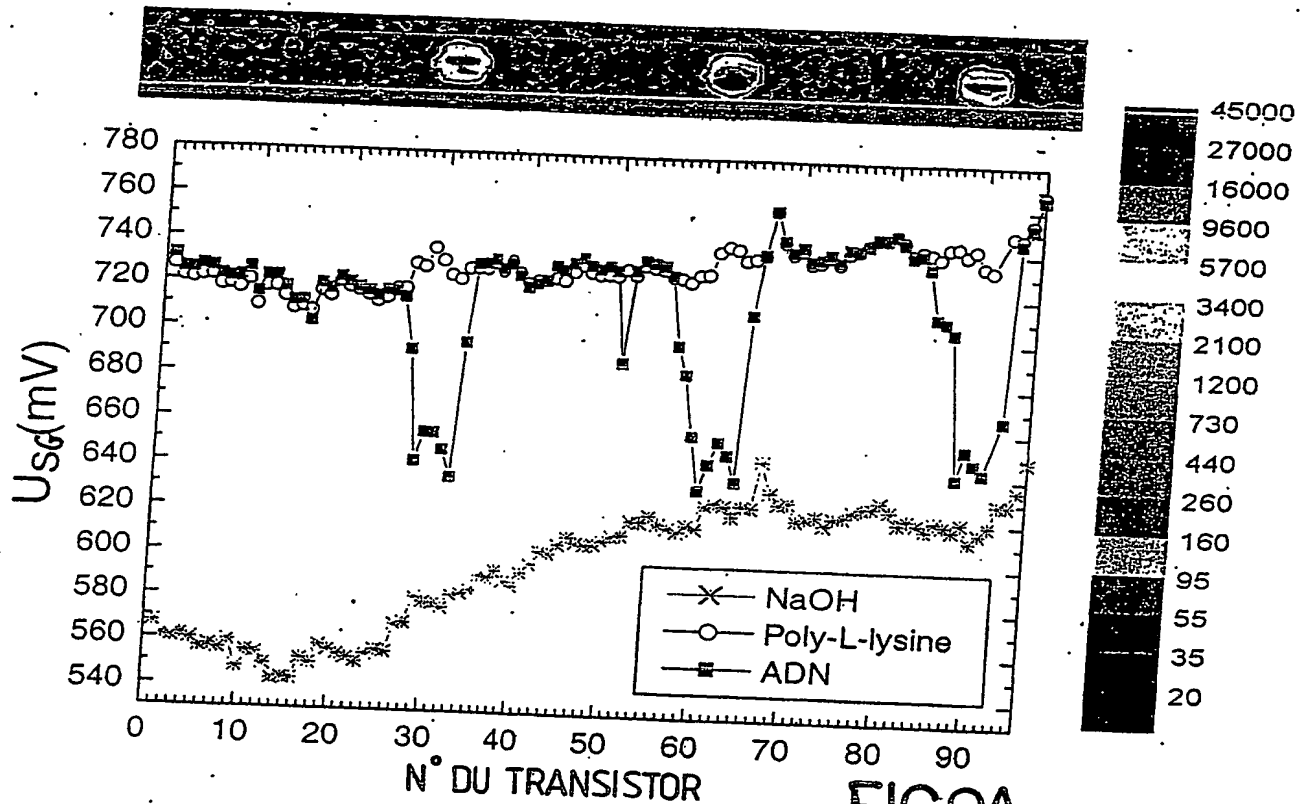


FIG.9A

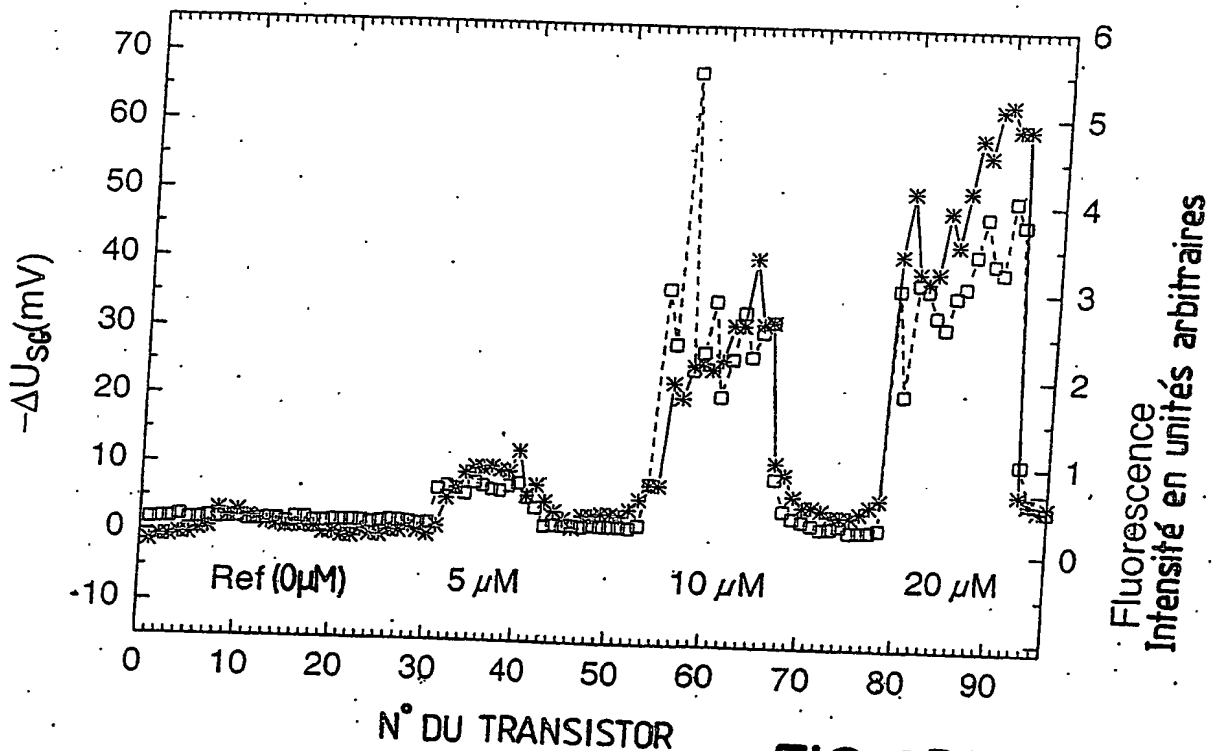
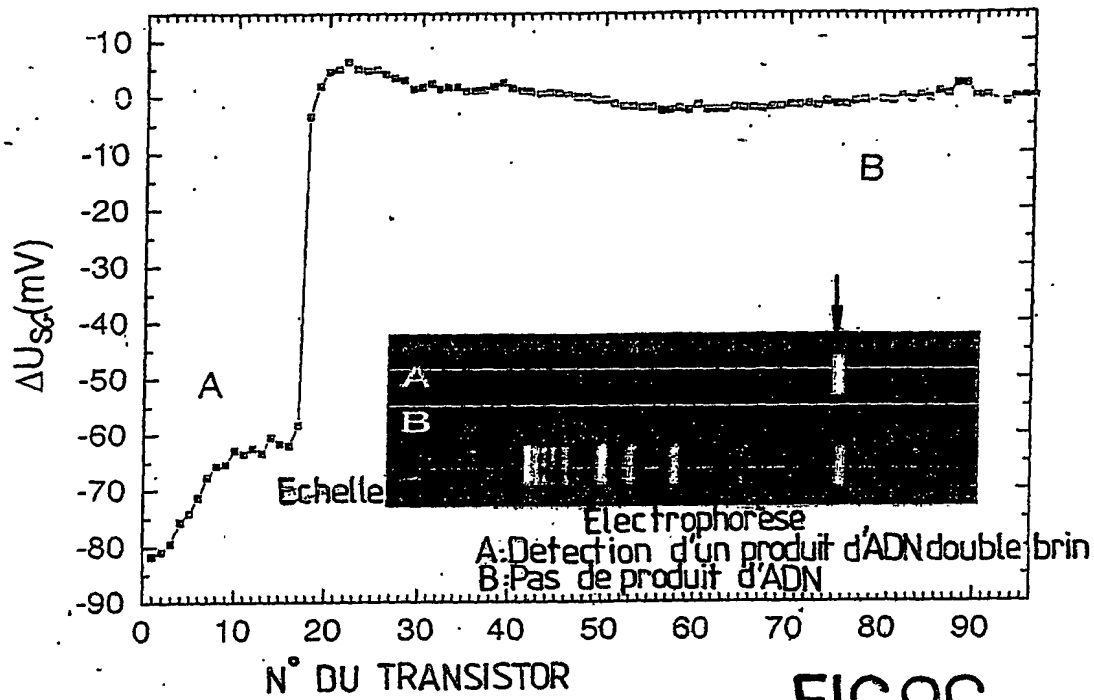
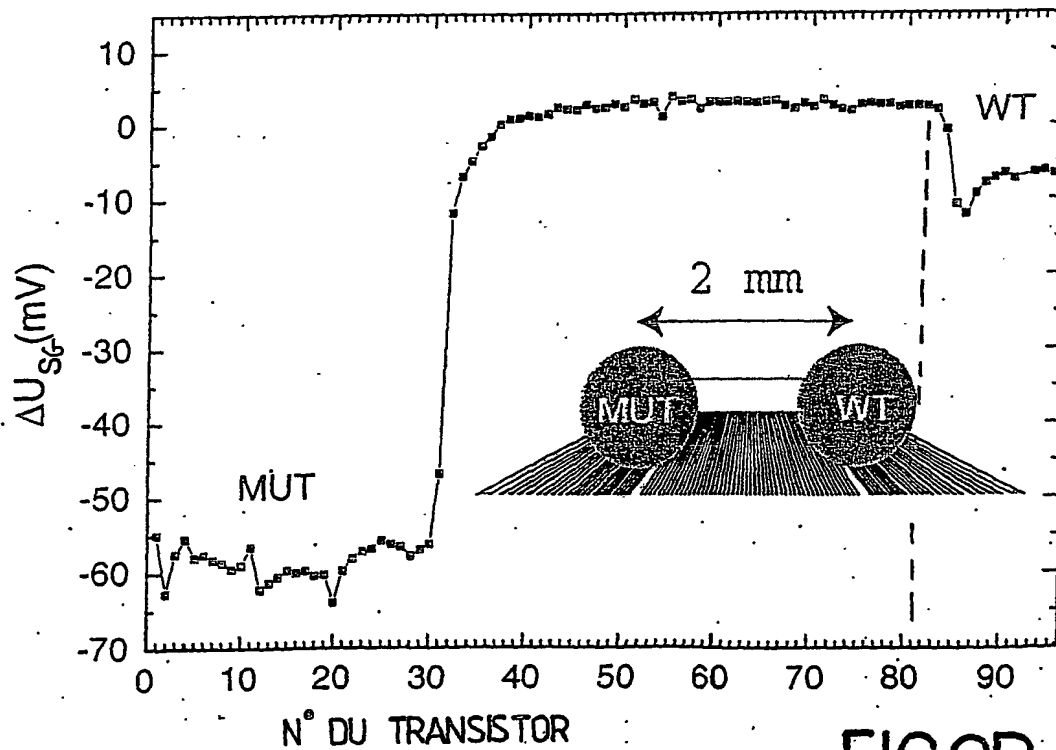
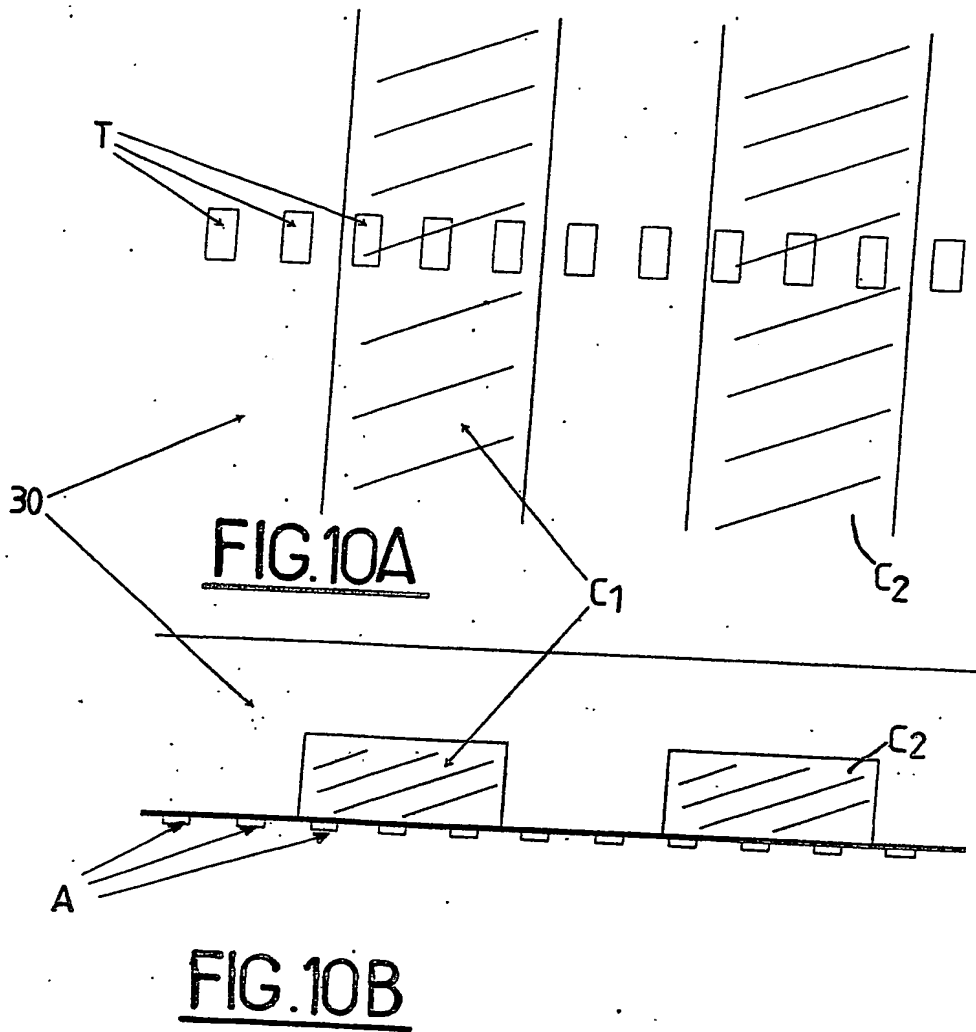


FIG.9B



11/12

FIG. 9CFIG. 9D



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**